

Neuroprotektive Effekte von Topiramat nach Hypoxie-Ischämie bei neugeborenen Ferkeln

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Nico Fiedler
geboren am 31.12.1978 in Heiligenstadt

Gutachter

1. Prof. Dr. U. Brandl, Jena
2. Prof. Dr. Chr. Mawrin, Jena
3. PD Dr. R. Trollmann, Zürich/Schweiz

Tag der öffentlichen Verteidigung: 4. September 2007

0. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACPD	1-Aminocyclopentan-15,3R-dicarboxylsäure
AMPA	Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
AP	Alkalische Phosphatase
DAB	3,3-Diamino-Benzidin-Tetrahydrochlorid
ECoG	Elektrocorticogramm
GABA	Gamma-amino-buttersäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HI	Versuchsgruppe mit Gabe von Placebo nach Hypoxie-Ischämie
HI-TPM10	Versuchsgruppe mit einer Topiramaterhaltungsdosis von 10 mg / kg /d
HI-TPM20	Versuchsgruppe mit einer Topiramaterhaltungsdosis von 20 mg / kg /d
HIE	hypoxisch-ischämische Enzephalopathie
MW	Mittelwert
MBP	myelinbasisches Protein
NaCl	Natriumchlorid
NMDA	N-methyl-D-aspartat
P4, P7, P11	Rattenjunge mit einem Lebensalter von 4 / 7 / 11 Tagen
PBS	phosphate buffered saline
PVL	periventrikuläre Leukomalazie
TPM	Topiramat
TUNEL	terminal desoxinukleotidyl-transferase-mediated dUTP <u>n</u> ick <u>e</u> nd <u>l</u> abeling

1. INHALTSVERZEICHNIS	Seite
0. Abkürzungsverzeichnis	3
1. Inhaltsverzeichnis	4
2. Zusammenfassung	7
3. Einleitung	9
3. 1. Hypoxisch-ischämische Hirnschädigungen in der Perinatalperiode	9
3. 2. Die Entwicklung des menschlichen Gehirns	12
3. 3. Pathophysiologie der hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie	14
3. 3. 1. Energiestoffwechsel	15
3. 3. 2. Akkumulation zytosolischen Kalziums	16
3. 3. 3. Exzitotoxizität	17
3. 3. 4. Freie Radikale	19
3. 3. 5. Entzündungsreaktion	20
3. 3. 6. Anfälle	20
3. 3. 7. No-reflow-Phänomen	21
3. 3. 8. Verzögerter Neuronenuntergang	21
3. 3. 9. Hypoxieresistenz des unreifen Gehirns	22
3. 3. 10. Selektive Vulnerabilität	23
3. 3. 11. Besonderheiten des hypoxisch-ischämischen Schadens beim unreifen Gehirn – eine Zusammenfassung	24
3. 4. Die Zelltodformen Nekrose und Apoptose	25
3. 4. 1. Apoptose	25
3. 4. 2. Nekrose	26
3. 4. 3. DNA-Fragmentation	26
3. 4. 4. Mechanismen der Apoptose	27

	Seite
3. 5. Die Neuropathologie der hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie	28
3. 5. 1. Altersabhängigkeit der Läsionsformen	28
3. 5. 2. Hirnödem	28
3. 5. 3. Selektive neuronale Nekrose	29
3. 5. 4. Parasagittale zerebrale Schädigung	31
3. 5. 5. Status marmoratus der Basalganglien und des Thalamus	31
3. 5. 6. Fokale und multifokale ischämische Hirnnekrosen	31
3. 5. 7. Periventrikuläre Leukomalazie	32
 3. 6. Therapieansätze der hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie	 35
3. 7. Topiramate	37
3. 8. Ziele der Arbeit	38
 4. Methodik	 39
4. 1. Allgemeines	39
4. 2. Herkunft der Tiere und Versuchsgruppen	39
4. 3. Anästhesie und operative Vorbereitungen	41
4. 4. Akute zerebrale Hypoxie-Ischämie	42
4. 5. Nachbeobachtungsphase	42
4. 6. Histopathologische Aufarbeitung	44
4. 6. 1. HE-Färbung	44
4. 6. 2. Immunhistochemische Färbung von MBP	45
4. 6. 3. TUNEL-Methode	47
4. 7. Histopathologische Auswertung	48
4. 7. 1. HE-Auswertung	48
4. 7. 2. Quantifizierung der Immunhistochemie	49
4. 7. 3. Quantifizierung der TUNEL-Färbung	49
4. 8. Statistische Auswertung	50

	Seite
5. Ergebnisse	51
5. 1. Pathophysiologische Ergebnisse	51
5. 2. Neuropathologische Ergebnisse	53
5. 2. 1. HE-Färbung	53
5. 2. 2. TUNEL-Färbung	58
5. 2. 3. MBP-Färbung	61
 6. Diskussion	 63
6. 1. Tiermodell	63
6. 2. Neuroscore	67
6. 3. Neuropathologische Auswirkungen der Hypoxie-Ischämie: Nekrose und Apoptose	67
6. 4. Auswirkungen der Behandlung mit Topiramat	74
6. 5. Beurteilung der weißen Substanz	77
 7. Schlussfolgerungen	 80
 8. Literatur- und Quellenverzeichnis	 82
 9. Anhang	 108
9. 1. Abbildungsverzeichnis	108
9. 2. Lebenslauf	109
9. 3. Liste der wissenschaftlichen Veröffentlichungen	110
9. 4. Danksagung	110
9. 5. Ehrenwörtliche Erklärung	111

2. ZUSAMMENFASSUNG

In der Perinatalperiode des Menschen ist die meist Asphyxie-bedingte hypoxisch-ischämische Hirnschädigung eine Hauptursache für eine erhöhte Mortalität und Morbidität. Die resultierende hypoxisch-ischämische Enzephalopathie (HIE) mit der möglichen Folge einer infantilen Zerebralparese kann lebenslange Einschränkungen für das Neugeborene bedeuten (Volpe 2001).

Der Sauerstoffmangel – als primäre Störung des Nervengewebes bei der HIE – triggert komplexe neurotoxische Kaskaden, z. B. die Akkumulation extrazellulären Glutamats (Exzitotoxizität), den Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration und die Induktion von programmiertem Zelltod (Johnston et al. 2001a). Diese Prozesse und somit die klinischen und morphologischen Zeichen der HIE entwickeln sich über mehrere Tage bis Wochen (verzögerter Neuronenuntergang: Horn und Schlote 1992, Johnston 2001, Towfighi et al. 1995). Hieraus ergibt sich ein „therapeutisches Fenster“ für mögliche neuroprotektive Interventionen in der Post-Insult-Periode.

Morphologisch lassen sich klassischerweise zwei Zelltodformen voneinander abgrenzen: die noxeninduzierte Nekrose mit Verlust der Zellmembranintegrität und die gesteuert ablaufende Apoptose mit Bildung membranumschlossener Vesikel (Gerschenson und Rotello 1992, Kerr et al. 1972). Die Bedeutung dieser beiden Zelltodformen für den Neuronenuntergang nach hypoxisch-ischämischem Insult wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Martin et al. 1998, Yue et al. 1997). Bei Reifgeborenen führt Hypoxie-Ischämie vorwiegend zu neuronalen Schäden und bei Frühgeborenen vorwiegend zu oligodendroglialen Schäden (Volpe 2001).

Für das klinische Management der perinatalen HIE haben sich - abgesehen von präventiven und symptomatischen Maßnahmen - spezifische neuroprotektive Interventionen bisher nicht etabliert. Für das Antiepileptikum Topiramat fanden sich Hinweise auf eine neuroprotektive Wirkung nach hypoxisch-ischämischem Insult bei Nagern (Lee et al. 2000, Liu et al. 2004). Um die Übertragbarkeit eines solchen Effekts auf Säuger und perspektivisch den Menschen zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit die klinischen und neuropathologischen Effekte der Topiramatgabe nach hypoxisch-ischämischem Insult anhand eines etablierten Ferkelmodells (Le Blanc et al. 1991) evaluiert.

Das Studienprotokoll sah eine 28-minütige Hirnischämie durch beidseitige Carotisokklusion, sowie eine zusätzliche hypoxische Ventilation während der letzten 13 Ischämieiminuten vor. Vier Gruppen zu je 8 weiblichen Ferkeln wurden untersucht.

Neben einer shamoperierten Kontrollgruppe erfolgte die verblindete Gabe von Placebo oder von Topiramat in zwei Dosierungen (10 mg/kg/d und 20 mg/kg/d). In der Nachbeobachtungszeit (68 h) wurden ein Monitoring physiologischer Parameter und regelmäßige neurologische Evaluationen durchgeführt. Anschließend wurden nekrotische Neuronenuntergänge durch konventionelle HE-Färbung, Apoptosen durch TUNEL-Technik und Schäden der weißen Substanz durch immunhistochemische Darstellung von myelinbasischem Protein quantifiziert.

Das vorliegende Tiermodell erwies sich geeignet zur Induktion eines signifikanten Hirnschadens, indem bei zwei Tieren eine letale Läsion und bei den übrigen ein konsistentes Ausmaß an leicht- bis mittelgradiger neuronaler Schädigung erzeugt werden konnte. Das erzeugte Schädigungsmuster entsprach im wesentlichen den für asphyktische Neugeborene (Volpe 1995) und Ferkelmodelle (Foster et al. 2001, Thoresen et al. 1996) beschriebenen häufigsten Läsionen. Durch Behandlung mit Topiramat nach dem Insult war eine Reduktion des nekrotischen Zellschadens möglich: in der 10mg-Gruppe tendenziell und in der 20mg-Gruppe signifikant. Diese Beobachtungen zeigen eine neuroprotektive Wirkung des Medikaments. Darauf deuten auch die im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenzielle Besserung des Neuroscores, die Reduktion der Anfallshäufigkeit und die geringere Letalität der Behandlungsgruppen hin. Als denkbare neuroprotektive Wirkmechanismen von Topiramat kommen die positiv modulatorische Wirkung auf GABA_A-Rezeptoren (White et al. 1997), sowie die negativ modulatorische Wirkung auf spannungs-aktivierte Natrium- und Kalziumkanäle (Alves et al. 2003) in Frage. Eine signifikante Beeinflussung der apoptotischen Zelluntergänge durch Topiramat war in den meisten Hirnregionen nicht nachweisbar. In der frontalen weißen Substanz der 20mg-Gruppe war jedoch ein proapoptotischer Effekt zu verzeichnen, der auch für andere Antiepileptika vorbeschrieben ist (Bittigau et al. 2002, Ikonomidou et al. 2001).

Die immunhistochemische Färbung von MBP zeigte in keiner Hirnregion den erwarteten Verlust der Immunreaktivität nach hypoxisch-ischämischem Insult. Folglich ist entweder das verwendete Tiermodell ungeeignet zur Erzeugung einer signifikanten Schädigung der weißen Substanz, oder die MBP-Degradation ist 68 Stunden nach Insult noch nicht signifikant vorangeschritten (Irving et al. 2001). Hier sind Untersuchungen an jüngeren Versuchstieren bzw. mit längerer Nachbeobachtungsphase erforderlich. Aussagen zum Einfluss von Topiramat auf die MBP-Immunreaktivität sind deshalb aus diesem Modell nicht ableitbar.

3. EINLEITUNG

3. 1. Hypoxisch-ischämische Hirnschädigungen in der Perinatalperiode

Die hypoxisch-ischämische Hirnschädigung in der Perinatalperiode ist sowohl bei Früh- als auch bei Reifgeborenen eine Hauptursache für eine erhöhte Mortalität und Morbidität und kann unter Umständen lebenslange Einschränkungen für das Neugeborene bedeuten (Volpe 2001). Die klinischen, pathophysiologischen und neuropathologischen Folgeerscheinungen einer perinatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung werden unter dem Begriff der **hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie** (HIE) zusammengefasst. Die primäre Störung des neuronalen Gewebes, die zur HIE führt, besteht in einem Sauerstoffmangel. Dieser kann durch zwei wesentliche Mechanismen bedingt sein: Hypoxie, d. h. eine Verminderung des Sauerstoffpartialdrucks im arteriellen Blut, und Ischämie, d. h. eine verminderte Hirndurchblutung, wobei letztere die häufigere und bedeutendere Form in der Pathogenese der hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie darstellt. Letztendlich führt auch eine reine Hypoxie zur Störung der myocardialen Funktion und der zerebrovaskulären Autoregulation und damit zur Ischämie des Gehirns (Volpe 1995). Perinatale ischämische Hirnläsionen können fokal, multifokal und generalisiert auftreten. Mögliche Ursachen für die selteneren fokalen und multifokalen ischämischen Hirnläsionen sind: Embolien (Plazentafragmente, Katheterembolien), Thrombosen (Meningitis-assoziierte Vaskulitis, Trauma), Gefäßmalformationen und zum überwiegenden Anteil idiopathische Faktoren. Häufiger jedoch treten in der Perinatalperiode Hypoxie und/oder Ischämie generalisiert und in Verbindung mit einer (prä- und intranatal) placentaren oder (postnatal) pulmonalen Gasaustauschstörung auf. Für diese so genannte **Asphyxie** ist demzufolge neben Hypoxie bzw. Ischämie auch die Hyperkapnie kennzeichnend. Letztere bedingt weitere metabolische und physiologische Effekte (z. B. zusätzliche respiratorische Azidose, deshalb: gemischte Azidose). Der asphyktische Zustand eines Feten bzw. Neugeborenen kann durch verschiedenste respiratorische, kardiale und zirkulatorische Störungen begründet sein. Zahlreiche Risikofaktoren sind für die perinatale Asphyxie bekannt, von denen maternale Erkrankungen (z. B. Infektionen), placentare Anomalien (z. B. Placentainfarzierung), Nabelschnurzwischenfälle (z. B. Prolaps) und fetale Ursachen (z. B. Frühgeburtlichkeit, kardiopulmonale Anomalien) genannt seien (Speer und Gahr 2000, Volpe 1995).

Die prozentuale Beteiligung der einzelnen zeitlichen Abschnitte der Perinatalperiode am Eintreten des primären Insults lässt sich noch nicht abschließend quantifizieren. Als Erfahrungswerte für Reifgeborene werden von Volpe angegeben, dass ca. 20% der Insulte mit pränatalen Ereignissen in Verbindung stehen, 35% intranatal bedingt sind, weitere 35% sowohl prä- als auch intranatale Ursachen haben, und die letzten 10% durch postnatale Störungen begründet sind. Für die Pathogenese der HIE bei Frühgeborenen spielen hingegen die postnatalen Faktoren eine größere Rolle (Volpe 1995). D. h. hypoxisch-ischämische Hirnschädigungen ereignen sich bei Reifgeborenen vorwiegend intrauterin und bei Frühgeborenen vorwiegend postnatal (Du Plessis und Volpe 2002).

Infolge der Asphyxie können sich hypoxisch-ischämische Läsionen an verschiedenen Organsystemen manifestieren. Der Ausprägungsgrad der Schädigungen ist dabei im Wesentlichen abhängig von Ausmaß und Dauer des Sauerstoffmangels, sowie vom Reifegrad des Neugeborenen. Die Folgen reichen von einer leichten Depression des Neonaten über reversible bis hin zu irreversiblen Organschäden. Folgende Organe sind bei Asphyxie am häufigsten in Mitleidenschaft gezogen (in Klammern die relative Häufigkeit nach Speer und Gahr 2000):

- Niere (50%): akute tubuläre oder kortikale Nekrose mit Oligurie bis Anurie
- ZNS (28%): hypoxisch-ischämische Enzephalopathie
- Herz (25%): postasphyktische Kardiomyopathie, Hypotension
- Lunge (23%): Atemnotsyndrom (RDS), persistierende fetale Zirkulation
- Magen-Darm-Trakt: nekrotisierende Enterokolitis, Ulzeration, Perforation
- Leber: Transaminasenanstieg, Defektkoagulopathie, Cholestase
- Mikrozirkulation: disseminierte intravasale Gerinnung

Während sich alle anderen Organe meist vom asphyktischen Insult erholen, ist dies beim Gehirn nicht immer der Fall. Die hypoxisch-ischämische Enzephalopathie ist in der Neonatalperiode klinisch typischerweise durch folgende Symptome gekennzeichnet (Speer und Gahr 2000):

- Beeinträchtigung des Bewusstseins: Hyperexzitabilität, Lethargie oder Koma
- EEG-Veränderungen und Krampfanfälle
- Änderung des Muskeltonus (meist Hypotonie, seltener Hypertonie)
- Änderung des Reflexverhaltens
- Atemstörungen: gestörte Atemmuster, respiratorische Insuffizienz

Neugeborene mit letaler hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung versterben meist im Zeitraum von 24 bis 72 Stunden postnatal. Dann verschlechtert sich die Vigilanz bis zum Koma, okulomotorische Störungen treten auf, die Atmung wird ataktisch und sistiert schließlich. Die Kinder, welche die ersten 72 Stunden überleben, zeigen in den folgenden Tagen und Wochen einen sich verbessernden Zustand. Dabei ist die Prognose umso besser, je schneller sich ihr neurologischer Status normalisiert (Volpe 1995).

Häufig entwickelt sich aus einer hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie jedoch das Bild einer **infantilen Zerebralparese** (Little-Krankheit), welche für den Betroffenen unter Umständen eine lebenslange medizinische, therapeutische und sozialmedizinische Betreuung erfordert. Zum Symptomenspektrum dieses Residualzustands verschiedener perinataler Hirnschädigungen gehören (Speer und Gahr 2000):

- Störungen motorischer Bewegungsabläufe in Form von Spastik, Dystonie und/oder Ataxie mit Sekundärproblemen wie Kontrakturen des Hüft-, Knie- und Fußgelenks sowie Hüftluxationen
- kognitive Störungen: von Lernstörung bis zur schweren geistigen Behinderung
- Wahrnehmungsstörungen: zerebrale Sehstörungen, selten Hörstörungen
- Epilepsie

Die medizinische und gesellschaftliche Bedeutung hypoxisch-ischämischer Hirnschädigungen in der Perinatalzeit verdeutlichen folgende epidemiologische Zahlen: Die hypoxisch-ischämische Enzephalopathie tritt mit einer Inzidenz von ca. ein bis zwei pro 1000 Lebendgeburten auf. Bei Reifgeborenen versterben davon ca. 10% in der Neonatalperiode, 30% zeigen bleibende Defizite, und 60% entwickeln sich normal. Bei Frühgeborenen versterben ca. 30% in der Neonatalperiode, 20% weisen bleibende Schäden auf und 50% genesen vollständig. Die Prävalenz der infantilen Zerebralparese beträgt in den meisten Ländern zwei bis drei pro 1000 Lebendgeburten, wobei 12 bis 23% der infantilen Zerebralparesen bei Reifgeborenen auf eine intranatale Asphyxie zurückgeführt werden können. Die HIE und ihre Folgeerscheinungen betreffen also eine große absolute Anzahl von Kindern und stellen große Quelle potentiell vermeidbarer neurologischer Morbidität dar (Volpe 1995).

3. 2. Die Entwicklung des menschlichen Gehirns (Volpe 1995)

Während die makromorphologische Entwicklung des menschlichen Gehirns am Ende des 3. Schwangerschaftsmonats im Wesentlichen abgeschlossen ist, erstreckt sich die mikromorphologische Strukturierung über einen längeren Zeitraum – ab dem 3. Schwangerschaftsmonat bis mehrere Jahre postnatal. Wichtige Elemente dieser Feinstrukturierung sind die neuronale Proliferation, die neuronale Migration, die Organisation und die Myelinisierung.

Die **neuronale Proliferation** vollzieht sich in der ventrikulären und subventrikulären Zone, welche subependymal im sich entwickelnden ZNS lokalisiert ist. Die Vermehrung von Neuronen findet hauptsächlich vom 2. bis 4. Schwangerschaftsmonat statt, während sich die Gliazellproliferation vom 2. Schwangerschaftsmonat bis ca. zum Ende des ersten postnatalen Jahres hinzieht. Die entstehenden postmitotischen Zellen (Neuroblasten und Glioblasten) wandern anschließend zu ihrem Bestimmungsort (**neuronale Migration**), differenzieren sich zu Neuronen oder spezifischen Gliazellen und formieren so den Cortex und die Kerngebiete. Der Peak der neuronalen Migration liegt im 3. bis 5. Schwangerschaftsmonat.

Die **Organisation** des Nervengewebes findet ab dem 5. Schwangerschaftsmonat bis einige Jahre nach der Geburt statt. Wichtige Elemente dieses Entwicklungsschrittes sind die Lamination (Ausrichtung und Strukturierung der Cortexschichten), die Ausbildung dendritischer und axonaler Verzweigungen, die Synaptogenese, der programmierte Zelltod und die selektive Elimination neuronaler Prozesse und Synapsen, sowie die Proliferation und Differenzierung der Glia. Etwa die Hälfte der produzierten neuronalen und glialen Zellelemente stirbt vor ihrer Ausreifung durch programmierten, gesteuerten Zelltod. Dieser Vorgang ist für die Strukturierung des Gehirns von essentieller Bedeutung, denn er dient sowohl der zahlenmäßigen Feinjustierung der verbundenen Neuronen, als auch der Elimination aberrierender Projektionen. Die Gliaproliferation vollzieht sich nicht nur in der (Sub-) Ventrikulärzone, sondern auch lokal (während oder nach der Migration).

Die **Myelinisierung** des Nervengewebes erstreckt sich über einen sehr langen Zeitraum: beginnend im zweiten Trimenon bis in die Erwachsenenzeit hinein. Sie wird durch eine rapide Proliferation der Glia eingeleitet, weshalb der DNA-Gehalt im Gehirn im zweiten Trimenon stark zunimmt. Ihre höchste Geschwindigkeit und deshalb auch Vulnerabilität erreicht die Myelinisierung in den ersten acht Lebensmonaten.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass das menschliche Gehirn auch nach der Geburt noch wichtige Entwicklungsschritte durchläuft, also weiter reift. Das unreife Gehirn des Neugeborenen unterscheidet sich vom reifen Gehirn des Erwachsenen auf vielfältige Weise: stattfindende Zellproliferation, Myelinisierung und Apoptose, niedrigerer Gehalt an Gliazellen, niedrigere metabolische Bedürfnisse, unterschiedliche Substratabhängigkeit und Enzymaktivitäten. Dies erklärt die Besonderheiten der Reaktion auf eine hypoxisch-ischämische Hirnschädigung im unreifen Gehirn im Vergleich zum reifen (siehe unten).

3. 3. Pathophysiologie der hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie

Die prinzipiellen biochemischen Mechanismen des Zelltods bei Hypoxie, Ischämie und Asphyxie sind wahrscheinlich sehr ähnlich, wenn nicht identisch. Sie werden durch den Sauerstoffmangel eingeleitet und beginnen mit der Störung des Hirnglucose- und -energiestoffwechsels. Jedoch ist inzwischen klar, dass diese Mechanismen nicht lediglich das Resultat des Energiemangels sind, sondern sich über Glucose- und Energiestoffwechsel hinaus erstrecken. Die umfangreiche Literatur zu diesem Thema zeugt von der Komplexität der Mechanismen, von denen im Folgenden die wichtigsten charakterisiert werden sollen (Volpe 1995). Vorangestellt sei eine schematische Übersicht über die wesentlichen Mechanismen, die bei der HIE zu Schädigung und Untergang von Neuronen beitragen (Abb. 1).

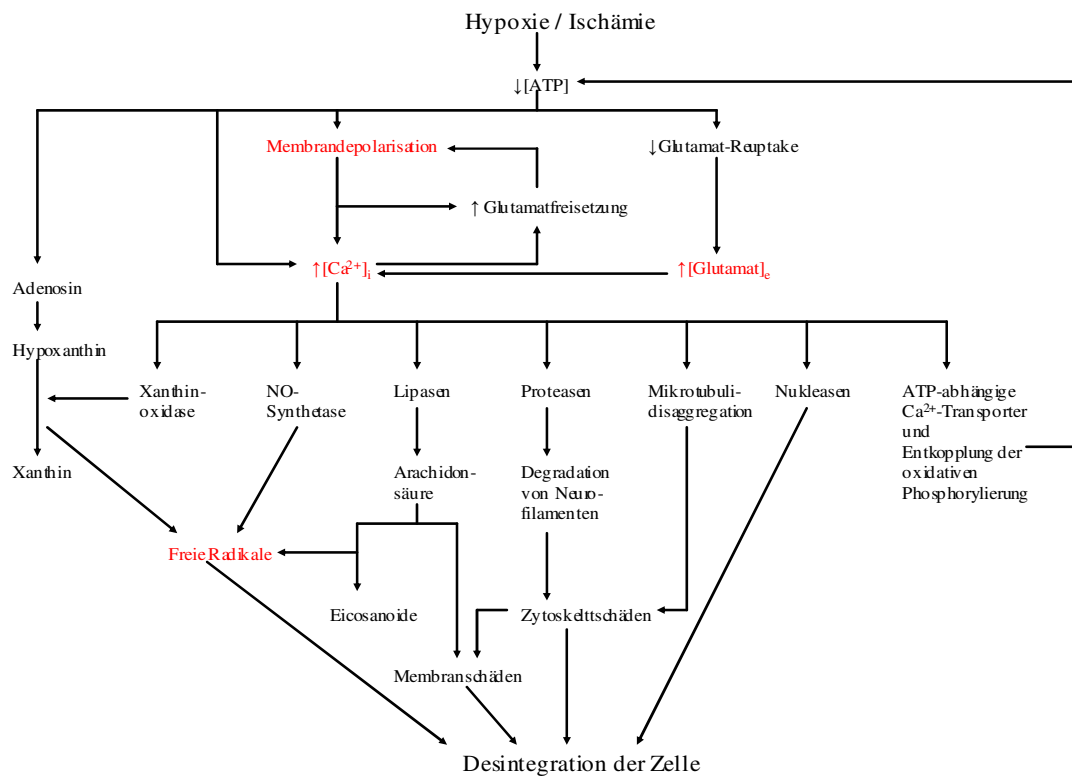


Abb. 1: Pathophysiologie der hypoxisch-ischämischen Neuronenschädigung (nach Volpe 2001)

3. 3. 1. Energiestoffwechsel

Die primäre Störung des Nervengewebes bei der HIE ist die mangelnde Versorgung mit Sauerstoff, welche durch Hypoxie und / oder Ischämie bedingt sein kann. Infolge des Sauerstoffmangels ist die mitochondriale oxidative Phosphorylierung als Energiequelle eingeschränkt. Es kommt innerhalb der ersten Minuten nach Beginn des Insults zu einem Abfall der Konzentrationen der energiereichen Phosphate (zunächst Phosphokreatin, dann ATP). Kompensatorisch erfolgt ein erhöhter Durchsatz durch die anaerobe Glycolyse, was bei nur geringer Energieausbeute (2 ATP pro Glucosemolekül) einen starken Glucoseverbrauch bewirkt. Dadurch sinkt der zerebrale Glucosespiegel ab, besonders bei gleichzeitig bestehender Ischämie. Als weitere Konsequenz der verstärkten anaeroben Glycolyse steigt der Laktatspiegel im Hirngewebe an, wodurch eine schwere Gewebeazidose resultiert. Letztere hat drei deletäre Folgen:

- Hemmung der zerebrovaskulären Autoregulation (Gefahr der ischämischen Hirnschädigung bei abfallendem zerebralen Perfusionsdruck)
- Hemmung der Phosphofruktokinase (Schlüsselenzym der Glykolyse, damit Verstärkung des Energiemangels)
- direkte Zellschädigung und letztendlich Nekrose. Ursachen sind wahrscheinlich eine Hemmung der mitochondrialen Atmung, die Veränderung H^+ -gekoppelter Membrantransporte und die Aktivierung freier Radikale (Fölsch et al. 2000, Kraig et al. 1987).

Der Mangel an energiereichen Phosphaten und die Persistenz dieses Zustands in der Post-Insult-Periode triggern mehrere nachgeschaltete Kaskaden, die wahrscheinlich durch drei wesentliche Ereignisse eingeleitet werden: Membrandepolarisation durch das Versagen der ATP-abhängigen Na^+ - K^+ -Pumpe, Akkumulation extrazellulären Glutamats (Exzitotoxizität) und Anstieg der zytosolischen Kalzium-Konzentration. Mechanismen, die durch diese Kaskaden aktiviert werden und zur weiteren Aggravation des Schadens beitragen sind die Bildung freier Radikale, die Einleitung einer Entzündungsreaktion und die Triggerung des programmierten Zelltods.

3. 3. 2. Akkumulation zytosolischen Kalziums

Eine große Datenmenge belegt die hohe Bedeutung der Akkumulation zytosolischen Kalziums während und nach Hypoxie-Ischämie für die Vermittlung des Zelltods (Choi und Hartley 1993, Hartmann und Kuschinsky 1989, Siesjö und Wieloch 1985).

Der Anstieg der zytosolischen Kalzium-Konzentration ist im Wesentlichen bedingt durch:

- Versagen energieabhängiger Kalziumpumpen in der Plasmamembran und dem endoplasmatischen Retikulum, die sonst die zytosolische Kalziumspiegel niedrig halten
- Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle der Plasmamembran infolge Membrandepolarisation
- Kalziumeinstrom durch Aktivierung Agonist-abhängiger Ionenkanäle (d. h. durch Glutamat aktivierte NMDA-Rezeptoren)

Die deletären Folgen erhöhter zytosolischer Kalziumkonzentrationen sind mannigfaltig und betreffen die Zelle auf mehrfache Weise. Dazu gehören (Johnston et al. 2001a, Volpe 2001):

- die Aktivierung von Phospholipasen: Membranschädigung durch Phospholipid-Hydrolyse; Erzeugung von Arachidonsäure mit Radikalbildung durch Zyκλο- und Lipoxygenase, sowie die nachfolgende Produktion proinflammatorischer Zytokine
- die Aktivierung von Proteasen mit folgender Proteolyse von Zytoskelett und anderen zellulären Proteinen
- die Aktivierung von Nukleasen mit konsekutiver DNA-Degradation
- die Stimulation der Neurotransmitterfreisetzung (Glutamat, Catecholamine) mit resultierender Glutamat-bedingter Exzitotoxizität und Radikalbildung durch Autooxidation der Catecholamine
- die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung, was den ATP-Mangel aggraviert
- Aktivierung von NO-Synthetase mit Produktion des toxischen NO
- Aktivierung einer Protease, die Xanthin-Dehydrogenase in Xanthin-Oxidase überführt, welche zur Radikalbildung beiträgt

3. 3. 3. Exzitotoxizität

Ein wichtiger pathogenetischer Mechanismus des hypoxisch-ischämisch bedingten neuronalen Zelltods, insbesondere beim unreifen Gehirn ist die Exzitotoxizität (Johnston 2001). Der Begriff „Exzitotoxizität“ wurde 1970 von John Olney geprägt und beschreibt den Zelltod durch exzessive Stimulation von Rezeptoren für exzitatorische Aminosäuren, insbesondere durch Glutamat (Johnston et al. 2001a). Die Bedeutung des glutamatinduzierten Zelltods bei Hypoxie-Ischämie konnte in vielen in vitro und in vivo Studien gezeigt werden (Barks und Silverstein 1992, Choi und Rothman 1990, Choi und Hartley 1993, McDonald und Johnston 1990).

Der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat wird an glutamatergen Synapsen durch Kalziumeinstrom in präsynaptische Nervenendigungen freigesetzt und entfaltet seine Wirkung (Depolarisation) an postsynaptischen Glutamatrezeptoren. Es sind zurzeit drei ionotrope und ein metabotroper Glutamatrezeptor bekannt (Choi 1992, Gasic und Hollmann 1992). Die ionotropen Rezeptoren (NMDA-Rezeptor, AMPA-Rezeptor, Kainat-Rezeptor) sind mit einem Kanal für Kalzium- und Natrium-Einstrom verbunden (Poulsen et al. 2004). Der metabotrope ACPD-Rezeptor führt über G-Protein-Kopplung zu diversen intrazellulären Effekten, z. B. zur Kalzium-Mobilisation aus dem endoplasmatischen Retikulum.

Die Glutamatwirkung wird unter physiologischen Bedingungen durch potente, energieabhängige Reuptake-Mechanismen in Astrozyten und präsynaptischen Nervenendigungen beendet. In den Astrozyten wird Glutamat ATP-abhängig zu Glutamin umgesetzt, welches zur präsynaptischen Nervenendigung diffundiert und zur Regeneration von Glutamat verwendet wird. Die Reuptakemechanismen müssen sehr effizient sein, denn die extrazelluläre Glutamatkonzentration ist normalerweise 1000fach niedriger als die intrazelluläre.

Die Funktion exzitatorischer Synapsen wird durch Hypoxie-Ischämie auf mehrfache Weise gestört (Johnston 2001, Johnston et al. 2001a):

- Es kommt zur exzessiven Freisetzung von Glutamat aus präsynaptischen Nervenendigungen durch Membrandepolarisation und erhöhte zytosolische Kalziumkonzentrationen.
- Die energieabhängigen Glutamat-Wiederaufnahme-Mechanismen in Astrozyten und präsynaptische Nervenendigungen versagen (Jabaudon et al. 2000, Silverstein et al. 1986a).

- Der hypoxisch-ischämisch bedingte Energiemangel führt zur Depolarisation der postsynaptischen neuronalen Membran mit nachfolgender Öffnung spannungsempfindlicher NMDA- und Kalzium-Kanäle (Gilland et al. 1998, Novelli et al. 1988).

Desweiteren setzen untergehende Neurone große Mengen Glutamat frei und tragen somit zu dessen extrazellulären Akkumulation bei. Der experimentelle Nachweis erhöhter extrazellulärer Glutamat Spiegel im Hirngewebe nach Hypoxie-Ischämie konnte durch intracerebrale Microdialyse (Silverstein et al. 1991, Tan et al. 1996), durch Liquoruntersuchungen (Hagberg et al. 1993, Riikonen et al. 1992) und Magnetresonanztomographie (Pu et al. 2000) für verschiedene Tiermodelle und den Menschen erbracht werden.

Das extrazellulär akkumulierende Glutamat führt zum sog. exzitotoxischen Zelltod, für den in der Literatur zwei Mechanismen beschrieben werden (Volpe 1995):

- der schnelle Zelltod, der innerhalb Minuten auftritt und durch Natrium-Einstrom infolge Glutamat-Rezeptor-Aktivierung bedingt wird. Es kommt zum passiven Einstrom von Chloridionen und Wasser, Zellschwellung und schließlich Lyse.
- der verzögerte Zelltod, der sich über Stunden hinzieht. Er wird durch NMDA-Rezeptor-Aktivierung mit folgendem Kalzium-Einstrom und Kalzium-vermittelte sekundäre Effekte bedingt. Er scheint die wichtigere Form des neuronalen Todes in vivo zu sein.

Obwohl alle Typen von Glutamatrezeptoren am Glutamat-induzierten Zelltod beteiligt sind, wurde in verschiedenen neonatalen Tiermodellen nachgewiesen, dass die vom NMDA-Rezeptor vermittelte Exzitotoxizität eine entscheidende Rolle spielt (Hagberg et al. 1994, Johnston 2001). Dabei scheint der NMDA-vermittelte Neuronenuntergang und somit Exzitotoxizität im sich entwickelnden Gehirn eine größere Rolle für den hypoxisch-ischämisch bedingten Zelluntergang zu spielen als im reifen Gehirn (Johnston et al. 2001a, McDonald et al. 1988). Ursächlich für dieses Phänomen sind die während der Hirnentwicklung transient verstärkte Expression der NMDA-Rezeptoren (Hattori und Wasterlain 1990, McDonald und Johnston 1990, Represa et al. 1989) sowie ihre phasenweise besonderen Eigenschaften: Unreife NMDA-Rezeptoren öffnen leichter in Gegenwart von Glutamat, haben längere Öffnungszeiten und sind durch einen größeren Kalzium-Einstrom charakterisiert als

reife NMDA-Rezeptoren (Johnston 2001, Monyer et al. 1994). Dies erklärt auch die Beobachtung, dass das unreife Gehirn viel exzitabler und epileptogen ist als das reife (Holmes und Ben-Ari 2001, Johnston 2001).

Glutamatrezeptoren, insbesondere der NMDA-Rezeptor, spielen während der Hirnentwicklung eine große Rolle für die aktivitätsabhängige neuronale Plastizität: Sie scheinen an Prozessen beteiligt zu sein wie: Neuritenwachstum, Synapsenbildung, Zelltod, selektive Elimination von neuronalen Prozessen und funktionelle Organisation neuronaler Systeme. Andererseits werden diese entwicklungsbedingt transient hoch exprimierten Glutamatrezeptoren zu unbeabsichtigten Mediatoren des neuronalen Todes bei Hypoxie-Ischämie. Im sich entwickelnden Gehirn ist die Exzitotoxizität somit die Achillesferse der Neurone, welche normalerweise von der trophischen Wirkung gut dosierter exzitatorischer Simulationen profitieren (Johnston 2001, Johnston et al 2001a).

Weitere Hinweise auf die Bedeutung von Glutamat bzgl. der Induktion von Zelltod bei Hypoxie-Ischämie sind:

- die enge Beziehung zwischen der regionalen neuronalen Vulnerabilität gegenüber Hypoxie-Ischämie und der topographischen Verteilung von Glutamat-Rezeptoren, insbesondere NMDA-Rezeptoren (McDonald und Johnston 1990)
- die in einer Reihe von perinatalen Hypoxie-Ischämie-Modellen experimentell gezeigte Möglichkeit, neuronalen Zelltod durch Behandlung mit Glutamat-Rezeptor-Blockern zu verhindern (Hattori et al. 1989, McDonald et al. 1987)

3. 3. 4. Freie Radikale

Die wichtige Rolle freier Radikale in der Vermittlung des Zelltods bei Hypoxie-Ischämie konnte bei einer Reihe von perinatalen in vitro und in vivo Studien gezeigt werden (Coyle und Puttfarcken 1993, Kitagawa et al. 1990). Quellen freier Radikale im Rahmen einer hypoxisch-ischämischen Gewebsschädigung sind (Flamm et al. 1978, Siesjö et al. 1989, Vannucci 1990):

- die mitochondriale Elektronentransportkette: Sauerstoffmangel verhindert die komplette Passage der Elektronen bis zur Cytochrom-C-Oxidase. Proximal dieses terminalen Enzyms entstehen dann freie Radikale.

- frühe reaktive Zellen: Die Mikroglia und die gefäßinfiltrierenden Leukozyten setzen Superoxidanionen frei (sog. respiratory burst) (Colton und Gilbert 1993, Lees 1993).
- Metallionen: Sie werden bei Ischämie aus ihrer Proteinbindung herausgelöst und katalysieren die Radikalbildung (Fölsch et al. 2000).
- der erhöhte intrazelluläre Kalziumspiegel: Kalzium aktiviert verschiedene Enzyme (z. B. Phospholipase A2, Xanthinoxidase, NO-Synthase), welche Radikale produzieren.

Die freigesetzten Radikale können dann in Kettenreaktionen mit anderen Zellmolekülen interagieren und diese dabei schädigen. So kommt es z.B. zur Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Zellmembranen, zu DNA-Schäden und zur Schädigung von Proteinen, die ungesättigte oder Sulhydrylgruppen enthalten. Außerdem wurde in einigen Modellen gezeigt, dass freie Radikale die neuronale Glutamat-Freisetzung steigern können (Till 1999).

3. 3. 5. Entzündungsreaktion

Im Rahmen einer Ischämie werden durch Zytokine (z. B. IL1, TNF α) leukozytäre und endotheliale Adhäsionsrezeptoren innerhalb weniger Stunden hochreguliert. Das führt zur vermehrten Marginalisation und Diapedese von Leukozyten und zur Auslösung einer Entzündungsreaktion (Fölsch et al. 2000, Hudome et al. 1997). Die physiologische Funktion dieses Prozesses ist in der Vorbereitung der Phagozytose nekrotischer Zellen und der Vorbereitung der Heilungsprozesse zu sehen. Unphysiologisch gesteigert ist dieser Vorgang in der Reperfusionphase. Die gefäßinfiltrierenden Leukozyten produzieren bei ihrer Aktivierung über die NADPH-Oxidase große Mengen an Superoxidanionen und setzen darüber hinaus proteolytische Enzyme frei, z. B. Elastase. Dies aggraviert den hypoxischen Gewebsschaden in der Phase der sich wieder etablierenden Perfusion (sog. Reperfusionsschaden, Till 1999).

3. 3. 6. Anfälle

Eine etablierte Komponente der HIE nach Asphyxie ist die Hyperaktivität des zerebralen Cortex, die sich durch Anfälle und abnorme elektrische Aktivität äußert (Johnston et al. 1995, Sarnat und Sarnat 1976). Anfälle treten meist nicht – wie in vielen Studienmodellen – bei Neugeborenen mit ansonsten gesunden Gehirnen auf,

sondern sind in der Regel Ergebnis einer zugrunde liegenden Hirnpathologie: Zerebrovaskuläre Erkrankungen sind für 50-60% aller Anfälle bei Reif- und Frühgeborenen verantwortlich. Perinatale HI ist mit 40% die häufigste Ursache neonataler Anfälle (Wirrell et al. 2001). Verschiedene Studien haben den Zusammenhang zwischen epileptischen Anfällen und einem möglichen resultierenden Zellschaden für das unreife Gehirn untersucht. Dabei zeigte sich, dass Anfälle neuronale Kreisläufe stören, das Hirnwachstum hemmen und letztendlich auch zum Nervenzelltod führen können (Lado et al. 2002, Wasterlain et al. 2002). Insbesondere können sie einen bereits bestehenden leichten bis mittelschweren, hypoxisch-ischämisch bedingten Zellschaden exazerbieren (Wirrell et al. 2001). Derzeit wird die Bedeutung einer Anfallsprophylaxe diskutiert. Eine Studie von Cataltepe (Cataltepe et al. 1995) zeigt, dass die Vorbeugung von Anfällen bei Kindern mit schwerer HIE nicht hilfreich ist, dass jedoch die Verhinderung von Anfällen bei Kindern mit leichter bis mittelschwerer HIE extrem wichtig ist.

3. 3. 7. No-reflow-Phänomen

Bei verschiedenen Erwachsenen-Tiermodellen zeigte sich, dass häufig auch nach Wiederherstellung eines Perfusionsdrucks keine ausreichende Rezirkulation erfolgt (Hossmann 1987). Dieses No-reflow-Phänomen ist umso wahrscheinlicher, je länger die Ischämiephase gedauert hat. Mögliche Mechanismen für dieses Phänomen sind: intravaskuläre Obstruktion durch Stase-bedingt abgelagerte Thrombozyten und Fibrin (Till 1999), vermehrte Anhaftung von Granulozyten am Endothel (Fölsch et al. 2000), Arteriolenkonstriktion durch erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration und vasokonstriktorisches Mediatoren (z. B. TxA_2 , welches aus Arachidonsäure entsteht), Schwellung perivaskulärer Astrozyten oder endothelialer Zellen (Ames et al. 1968).

3. 3. 8. Verzögerter Neuronenuntergang

Experimentelle Beobachtungen haben gezeigt, dass sich der Neuronenuntergang im Rahmen einer reversiblen Hypoxie-Ischämie in zwei distinkten Phasen vollzieht. Die erste Schädigung („primäre Phase“) tritt während des Insults und der unmittelbaren Reperfusion-/Reoxygenationsphase auf. Nach einer Latenz von einigen Stunden kommt es zum verzögerten Neuronenuntergang („sekundäre Phase“), der sich bis zu 72 Stunden nach Insult und länger hinziehen kann (Horn und Schlote 1992, Johnston 2001, Petito et al. 1987). Diese zweite Phase konnte MR-spektroskopisch als

sogenanntes „verzögertes mitochondriales Energieversagen“ nachgewiesen werden, d. h. nach initialer Normalisierung kommt es zu einem verzögerten Abfall energiereicher Phosphate und Anstieg von Laktat (Hanrahan et al. 1996, Lorek et al. 1994, Penrice et al. 1997). Während in der primären Phase oben genannte Schädigungsmechanismen zum Zelltod führen, scheint für den verzögerten Neuronenuntergang in der sekundären Phase neben diesen sich selbst erhaltenden Kaskaden (Abe et al. 1995, Johnston et al. 2001a, Thoresen et al. 1995) eine inadäquate Induktion von Apoptose für den Zelluntergang verantwortlich zu sein (Beilharz et al. 1995, Nakajima et al. 2000). Dieser verzögerte Tod des Gehirns in den Stunden nach Beendigung des Insults ist insofern von Bedeutung als dass er Möglichkeiten für therapeutische Interventionen in der Post-Insult-Periode eröffnet („therapeutisches Fenster“).

3. 3. 9. Hypoxieresistenz des unreifen Gehirns

Ein langjährig etablierter und für viele Säugetierarten – einschließlich des Menschen - bekannter Fakt ist die größere Resistenz der Hirne jüngerer Individuen im Vergleich zu denen älterer Vertreter gegenüber hypoxisch-ischämischen Einwirkungen (Fazekas et al. 1941). Obwohl diese Erscheinung noch nicht vollständig verstanden ist, konnten einige ihrer physiologischen und biochemischen Grundlagen experimentell aufgeklärt werden, die auf besondere Eigenschaften des perinatalen Hirns im Vergleich zum adulten zurückgehen. Erwähnt seien:

- der niedrigere relative zerebrale Energieverbrauch. Dies ist die Folge der anatomischen und elektrophysiologischen Unreife des perinatalen Gehirns, d. h. die noch weniger entwickelten Dendritenbäume und synaptischen Verbindungen verbrauchen weniger ATP für Transportprozesse (Vannucci 1990, Vannucci 1992).
- die geringere Akkumulation von Laktat bei Hypoxie-Ischämie infolge der geringeren Kapazität des Glucose-Uptakes und der geringeren Aktivität der Hexokinase.
- die Fähigkeit, Laktat und Ketonkörper zum Energiegewinn zu verstoffwechseln. Selbst unter Hypoxie reicht die geringe verfügbare Sauerstoffmenge scheinbar noch zur Verwertung dieser Brennstoffe aus (Dombrowski 1989).

- die relativ größere Hypoxie-Ischämie-Resistenz des Myokards, d. h. Hypoxie-bedingtes Herzversagen tritt später als bei Adulten auf (Dawes 1968). Dies ist bedingt durch die größeren myokardialen Glykogenvorräte (Mott 1961) und größere aerobe Kapazität der Mitochondrien, d. h. Toleranz niedrigerer Sauerstofflevel (Wells et al. 1972).

In Modellen mit fetalen Lämmern und neugeborenen Ferkeln ist gezeigt worden, dass für die schweren Auswirkungen hypoxisch-ischämischer Insulte die Ischämie von besonderer Wichtigkeit ist. In beiden Tiermodellen, führte alleinige Hypoxie nicht zu Hirnschädigungen, bis sie mit Hypotension kombiniert wurde. Beim Ferkel scheint die Hypotension besonders eine Folge der kardialen Dysfunktion zu sein (De Courten-Myers et al. 1989).

3. 3. 10. Selektive Vulnerabilität

Trotz dieser relativen Resistenz des unreifen Hirns gegenüber hypoxisch-ischämische Einwirkungen, muss beachtet werden, dass einige Neuronengruppen in der Perinatalphase eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber diesen Noxen zeigen, als die entsprechenden Neuronengruppen beim Erwachsenen (Johnston 2001, Johnston et al. 2001a). Diese erhöhte Vulnerabilität scheint primär der Aktivierung von Rezeptoren exzitatorischer Aminosäuren geschuldet zu sein. Solche Hypoxie-Ischämie-vulnerablen Regionen sind:

- beim Frühgeborenen die periventrikuläre weiße Substanz mit der klinischen Folge einer spastischen Paraplegie (Volpe 1997)
- beim Reifgeborenen der perirolandische Cortex, der ventrolaterale Thalamus und das posteriore Putamen mit der klinischen Folge einer schweren motorischen Behinderung (Martin et al. 1997a, Pasternak und Gorey 1998)

Bemerkenswert ist, dass jede dieser Regionen das Ziel exzitatorischer glutamaterger Projektionen ist, was sie bei Hypoxie-Ischämie zu Glutamat-induzierter Exzitotoxizität prädisponiert (Johnston und Hoon 2000, Olney et al. 1986, Pu et al. 2000). Andere Regionen sind weniger vulnerabel, weil die exzitatorischen Neuronenkreise in der Neonatalperiode dort weniger gut ausgebildet sind. Die Bedeutung der Dichte der NMDA-Rezeptoren für die Determination der Vulnerabilität und Topographie des hypoxisch-ischämischen Zelltods wurde für den Menschen gezeigt (Barks et al. 1988, Hattori und Wasterlain 1990, Represa et al. 1989).

3. 3. 11. Besonderheiten des hypoxisch-ischämischen Schadens beim unreifen Gehirn – eine Zusammenfassung(Johnston 2001, Johnston et al. 2001a)

1. Im Vergleich zum reifen Gehirn eines Erwachsenen ist das fetale und neonatale Gehirn relativ hypoxieresistent. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass alleinige akute Hypoxie dem fetalen oder neugeborenen Gehirn Schaden zufügt (Johnston et al. 1995). Dies wird erst durch Kombination von **Hypoxie plus Ischämie** erreicht. Ebenso konnte in mehreren Experimenten nachgewiesen werden, dass die meisten hypoxischen Schädigungen bei Feten und Neugeborenen die Folge einer kombinierten Einwirkung von Hypoxie und Ischämie darstellen (Vannucci 1990).
2. Die klinischen Zeichen und der morphologische Hirnschaden der HIE entwickeln sich über mehrere Tage bis Wochen nach einer initialen Verzögerung (Nakajima et al. 2000, Sarnat und Sarnat 1976). Dies deutet darauf hin, dass die Hypoxie-Ischämie eine **neurotoxische Kaskade** auslöst, welche sich während dieses Zeitraumes entwickelt und zum Untergang von Neuronen und anderen Zellen führt (Towfighi et al. 1995). Daraus ergibt sich ein therapeutisches Fenster für mögliche neuroprotektive Interventionen.
3. Der sich entwickelnde Hirnschaden wird begleitet von **erhöhter neuronaler Erregbarkeit** mit häufigen Anfällen und elektroenzephalographischen Abnormitäten (Biagioni et al. 2001, Sarnat und Sarnat 1976, Williams et al. 1992). Generell ist das unreife Gehirn viel exzitabler und epileptogen ist als das reife Gehirn (Holmes und Ben-Ari 2001).
4. Spezifische Hirnstrukturen sind besonders anfällig für eine hypoxisch-ischämische Schädigung (Konzept der **selektiven Vulnerabilität**, Johnston 1998, Volpe 1997). Dies führt zu spezifischen neurologischen Defiziten, z. B. zur extrapyramidalen zerebralen Lähmung durch Basalganglienschädigung oder zur spastischen Paraplegie durch periventrikuläre Leukomalazie.

3. 4. Die Zelltodformen Nekrose und Apoptose

Die Form eines Zelltodes kann nach verschiedenen Kriterien klassifiziert werden. Nach den Bedingungen, die zum Absterben der Zelle führen unterscheidet man zwischen physiologischem und pathologischem Zelltod. Der normale, physiologische Zelltod – auch **programmierter Zelltod** genannt – spielt u. a. eine große Rolle bei Wachstum und Differenzierung der Organe, einschließlich des Gehirns (Johnston et al. 2001b), bei der Involution hormonsensitiver Organe nach Hormonentzug (Prostata, Endometrium) und tritt kontinuierlich in proliferierenden Geweben (Darmepithel, Leber) auf. Unzureichender programmierter Zelltod einerseits kann zu Störungen wie Krebs (Bursch et al. 1990, Kerr et al. 1972) führen, und übersteigter programmierter Zelltod andererseits z. B. zu neurodegenerativen Erkrankungen (Lefebvre et al. 1995, Roy et al. 1995). Abzugrenzen davon ist der **pathologische Zelltod** (akzidenteller Zelltod), der auf äußere Einwirkungen (traumatisch, hypoxisch-ischämisch, thermisch, toxisch) zurückzuführen ist.

Nach morphologischen und biochemischen Kriterien wurden in den vergangenen Jahrzehnten zwei distinkte Zelltodformen voneinander abgegrenzt: Apoptose und Nekrose (Kerr 1971, Kerr et al. 1972, Wyllie et al. 1980). Dabei wurde der physiologische, programmierte Zelltod üblicherweise als Apoptose angesehen, die durch einen intrinsischen, aktiven Mechanismen gesteuert würde (Gerschenson und Rotello 1992). Der pathologische Zelltod wurde dagegen als Nekrose betrachtet, die durch eine Störung der Zelle von außen bewirkt würde (Mergner und Trump 1990). In letzter Zeit wurde dieses strenge, binäre Zelltod-Konzept in Frage gestellt – in Anbetracht des Vorkommens intermediärer Zelltodformen, die nicht klar der Apoptose oder der Nekrose zugeordnet werden können (Clarke 1990, Portera-Cailliau et al. 1997).

Klassischerweise lassen sich diese beiden Zelltodformen morphologisch wie folgt abgrenzen:

3. 4. 1. Apoptose

Als erstes morphologisches Zeichen kommt es zu einer Chromatinkondensation (Karyopyknose) und der Nukleolus desintegriert (verschwindet). Dann kondensiert das Zytoplasma unter Ausbildung vieler kleiner Zytoplasmavakuolen, wobei folglich die Zelle schrumpft. Letztendlich fragmentiert der Zellkern (Karyorrhexis), und die Zelle löst sich in so genannte Apoptosekörper auf, d. h. Vesikel, die Zytoplasma,

Kernfragmente und intakte Organellen enthalten („Budding“). Im Gegensatz zur Nekrose bleiben Zellmembran und Mitochondrien intakt. Die Apoptosekörper werden von benachbarten Zellen phagozytiert, typischerweise ohne eine Entzündungsreaktion auszulösen (Kerr et al. 1972, Martin et al. 1998, Yue et al. 1997).

3. 4. 2. Nekrose

Ausgelöst durch äußere Störungen, wie Hypoxie-Ischämie, Toxine oder Trauma können insbesondere pathogenetische Mechanismen wie die Störung der Zellvolumen-Homöostase, der Mitochondrienfunktion (Energemangel) und Membrandefekte zur Nekrose einer Zelle führen (Laiho et al. 1971, Mergner und Trump 1990). Morphologische Merkmale sind eine unregelmäßige Chromatinkondensation (Karyopyknose), Zellschwellung, Schwellung und strukturelle Schädigung von Zellorganellen (Mitochondrien, Ribosomen, Zytoskelett), und schließlich Verlust der Membranintegrität des Kerns (Karyolyse) und der Zelle. Die dadurch freigesetzten Zellbestandteile lösen eine Entzündungsreaktion aus, mit Leukozyteninfiltration und Gewebeödem (Ma et al. 1998, Puka-Sundvall et al. 2000, Yue et al. 1997). Ein Charakteristikum der Nekrose ist ihre „Dosisabhängigkeit“, d. h. je schwerer der umweltbedingte Insult ist, umso schneller schreitet sie voran. Im Rahmen der zerebralen Ischämie wird dies als „Maturation phenomenon“ bezeichnet, will sagen je schwerer der ischämische Insult, umso rapider die Progression des neuronalen Schadens (Ito et al. 1975).

3. 4. 3. DNA-Fragmentation

Ein Zeichen irreversiblen Zelltods ist die DNA-Fragmentation, welche z. B. durch Gelelektrophorese oder durch in-situ-Techniken (wie TUNEL) nachgewiesen werden kann. Die DNA-Spaltung ist Folge der Aktivität intrinsischer Endonukleasen. Das Muster der DNA-Spaltung wird zur biochemischen Klassifikation der Zelltodformen eingesetzt. So gilt eine regelmäßige, internucleosomale DNA-Fragmentation und ein entsprechendes „Leiter-Muster“ in der Gelelektrophorese als indikativ für Apoptose (Liu et al. 1997). Im Gegensatz dazu spalten die Endonukleasen die DNA bei Nekrose weniger selektiv (vermutlich weil die koaktivierten Proteasen Histone spalten und so den Zugang zur nukleosomalen DNA erleichtern). Es resultiert eine zufällige DNA-Fragmentation mit einem „Schmier-Muster“ in der Gelelektrophorese (Tominaga

et al. 1993). Allerdings sind auch die Grenzen dieses Konzeptes aufgezeigt worden, z.B. durch Nachweis internukleosomaler DNA-Fragmentation bei Nekrose (Fukuda et al. 1993), bzw. durch Darstellung von Apoptose ohne begleitende internukleosomale DNA-Fragmentation (Collins et al. 1992, Oberhammer et al. 1993, Tomei et al. 1993).

3. 4. 4. Mechanismen der Apoptose

Im Säugerhirn sind zwei Hauptwege der Apoptose identifiziert worden (Banasiak et al. 2000, Budd et al. 2000, Hengartner 2000, Johnston 2001a):

- **Extrinsischer Todesrezeptor-Pfad:** Er wird getriggert durch Aktivierung von zellmembrangebundenen „Todesrezeptoren“, z. B. Fas/Apo1/CD95. Diese aktivieren nachgeschaltete intrazelluläre Signalwege, die zur Aktivierung von Caspase 8 führen, welche dann Caspase 3 aktiviert.
- **Mitochondrialer Pfad:** Er dient der Elimination alternder oder beschädigter Zellen und wird durch extrazelluläre Stressoren oder interne Signale, z. B. DNA-Schaden aktiviert. Geschädigte Mitochondrien setzen mitochondriale Proteine, insbesondere Cytochrom C ins Zytosol frei, welches dann Caspase 3 aktiviert (Li et al. 1997). Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung des mitochondrialen Pfads der Apoptose eine Rolle für den verzögerten Zelltod bei zerebraler Ischämie im sich entwickelnden Gehirn spielt (Puka-Sundvall et al. 2000).

Die Zysteinprotease Caspase 3 stellt eine Hauptkomponente in der Ausführung des Apoptoseprogrammes in vielen Zellen dar. Sie aktiviert verschiedene Proteine, die dann zur Ausführung apoptotischer Programme (z.B. DNA-Spaltung) führen (Cheng et al. 1998, Johnston et al. 2001a).

Die Bedeutung der Zelltodformen Apoptose und Nekrose für den Neuronenuntergang nach exzitotoxischem und nach hypoxisch-ischämischem Insult werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Neben Merkmalen der Noxe (z.B. Stärke des Insults) scheinen intrinsische Eigenschaften der geschädigten Zelle eine Rolle für die „Entscheidung“ in Richtung Apoptose bzw. Nekrose zu spielen (siehe Diskussion).

3. 5. Die Neuropathologie der hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie

Die neuropathologischen Merkmale der neonatalen hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie variieren beträchtlich mit dem Gestationsalter des Kindes, der Art des Insults, dem Typ der Interventionen und anderen, noch zu definierenden Faktoren (Volpe 1995).

3. 5. 1. Altersabhängigkeit der Läsionsformen (Speer und Gahr 2000):

Pathogene Ereignisse, die das sich entwickelnde Gehirn betreffen, verursachen Fehlbildungen oder Läsionen, deren Muster abhängig vom Stadium der Hirnentwicklung sind. In der Embryonal- und frühen Fetalperiode (bis 24. Woche) führen genetische oder exogene (hypoxische oder infektiöse) Störungen zu Fehlbildungsmustern (z. B. Heterotopien, Lissenzephalie, Polymikrogyrie). Ab dem späten zweiten Trimenon (24. SSW) bestimmen Schädigungsmuster im Sinne von Defektbildungen das Bild. Dabei stehen von der 24. bis 36. SSW (bei Frühgeborenen) periventrikuläre Schädigungen der weißen Substanz im Vordergrund (periventrikuläre Leukomalazie, peri-/intraventrikuläre Blutung), während ab der 37.SSW (Reifgeborene) die graue Substanz Prädilektionsstelle einer (meist hypoxisch-ischämischen) Schädigung ist. Das heißt: Hypoxie-Ischämie führt bei Reifgeborenen vorwiegend zu neuronalen Schäden und bei Frühgeborenen vorwiegend zu oligodendroglialen Schäden (Volpe 2001). Dabei sind die Kenntnisse über die biochemischen Ereignisse, die zum neuronalen Schaden bei Hypoxie-Ischämie führen, und über mögliche neuroprotektive Therapieansätze zur Zeit besser als das Verständnis der oligodendroglialen Schädigung. Typische Läsionsmuster bei Reifgeborenen sind die selektive neuronale Nekrose und die bilaterale parasagittale Infarzierung, sowie seltener der Status marmoratus und (multi-)fokale ischämische Hirnläsionen.

3. 5. 2. Hirnödem

Im Gegensatz zum Erwachsenen scheint bei der perinatalen hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie das sich entwickelnde Hirnödem kein eigenständiger und dominanter pathogenetischer Faktor zu sein. In pathologischen (Rorke 1992) und klinischen (Lupton et al. 1988) Studien konnte gezeigt werden, dass die primäre Hirnschwellung kein prominentes Merkmal der HIE bei menschlichen Neugeborenen ist, also eine relative Resistenz des unreifen Gehirns gegenüber der Entwicklung

eines hypoxisch-ischämisch induzierten Hirnödems besteht (Streicher et al. 1965). Ein frühes Hirnödem ist eher die Konsequenz größerer Gewebenekrosen, als die Ursache für Gewebeuntergänge. Ein Hirnödem erreicht selten ein solches Ausmaß, dass die Hirnperfusion gestört wird oder Einklemmungserscheinungen resultieren (Stonestreet et al. 1992).

Zu Beginn einer ischämischen Schädigung findet sich hauptsächlich ein zytotoxisches Ödem, während sich innerhalb weniger Tage zusätzlich ein vasogenes Ödem entwickelt. Beim zytotoxischen Hirnödem kommt es zu einer Schwellung von Neuronen, Gliazellen und Endothelzellen. Ursache sind einerseits ein erhöhter Natriumeinstrom in die Zellen (durch Hemmung der Na-K-ATPase, durch Glutamat-aktivierte Ionenkanäle und durch Na/H-Austauscher), andererseits die infolge des Abbaus zellulärer Strukturen vermehrt vorliegenden osmotisch wirksamen Teilchen. Grundlage des vasogenen Hirnödems ist eine massive Schädigung der Blut-Hirn-Schranke mit erhöhter Durchlässigkeit der Zonulae occludentes („tight junctions“). Folge des Hirnödems ist eine Steigerung des intrakraniellen Drucks mit resultierender Einschränkung der Gewebsperfusion im Sinne eines Circulus vitiosus (Fölsch et al. 2000).

3. 5. 3. Selektive neuronale Nekrose

Die selektive neuronale Nekrose ist die häufigste Läsionsart, die bei neonataler HIE beobachtet wird, und bezieht sich auf die Nekrose von Neuronen in einer charakteristischen – obwohl oft weit verstreuten – Verteilung. Die neuronale Nekrose tritt oft mit anderen spezifischen, neuropathologischen Manifestationen der neonatalen HIE auf.

Im Hirngewebe sind Neurone die Zellen, die am empfindlichsten auf Hypoxie-Ischämie reagieren (Hypoxie-Vulnerabilität: Neuron > Oligodendroglia > Astrozyten > Microglia; Scholz 1963). Die erste, nach ca. 5 bis 30 Minuten nach Beginn der Hypoxie-Ischämie beobachtbare Veränderung in Neuronen ist eine zytoplasmatische Vakuolisierung, die durch Mitochondrienschwellung hervorgerufen wird (Brown und Brierley 1973). Die wichtigsten mit klassischer Lichtmikroskopie feststellbaren morphologischen Änderungen treten nach 24 bis 36 Stunden auf. Dazu gehören: Schrumpfung, gesteigerte Eosinophilie des neuronalen Zytoplasmas, Verlust der Nissl-Substanz (endoplasmatisches Retikulum), Kondensation und Desintegration der Kerne. Kurz darauf treten verstärkt aktivierte Mikrogliazellen (elongierte,

pleomorphe Mikroglia) auf, die nekrotisches Zellmaterial phagozytieren und nach 36 bis 48 Stunden zu Schaummakrophagen werden. Nach 3 bis 5 Tagen erscheinen hypertrophe, proliferierende Astrozyten, die in den nächsten Wochen eine gliale Fasermatte ausbilden. Schwere Läsionen können zur Höhlenbildung führen, insbesondere im Cortex (Rorke 1992).

Prädilektionsstellen für die selektive neuronale Nekrose beim Reifgeborenen sind (Friede 1989, Rorke 1982, Streicher et al. 1965):

- Hippocampus: Die Pyramidenzellen des Hippocampus, insbesondere des Sommer'schen Sektors sind die Hypoxie-empfindlichsten.
- zerebraler Cortex: Bei etwas schwererer Hypoxie-Ischämie werden die besser differenzierten Neurone im visuellen, prä- und postzentralen Cortex geschädigt. Bei sehr schwerer Schädigung ist der Cortex diffus beteiligt. Neuronen in tieferen Cortex-Laminae und besonders in der Tiefe der Sulci sind besonders betroffen.
- Basalganglien und Thalamus
- Purkinjezellen des Kleinhirns
- kraniale Hirnnervenkerne des Hirnstamms (Leech und Alvord 1977).
- Vorderhornzellen des Rückenmarks (Clancy et al. 1989)

Ursachen für die selektive Vulnerabilität bestimmter Neuronengruppen im ZNS sind:

- regionale vaskuläre Faktoren: Neuronale Schäden treten eher in Grenzzonen der Durchblutung auf, d. h. in der Tiefe der Sulci und im parasagittalen zerebralen Cortex.
- regionale metabolische Faktoren: z. B. regionale Unterschiede in der anaeroben glykolytischen Kapazität, im Energieverbrauch, in der Empfindlichkeit der mitochondrialen Zytochromoxidase-Aktivität (Nelson und Silverstein 1991).
- regionale Verteilung der Glutamat-Rezeptoren, insbesondere vom NMDA-Typ, als wichtigste Determinante für die Verteilung der selektiven neuronalen Nekrose (D'Souza et al. 1992).

3. 5. 4. Parasagittale zerebrale Schädigung

Dies bezeichnet eine Nekrose des zerebralen Cortex und der benachbarten subkortikalen weißen Substanz mit einer charakteristischen Lokalisation, d. h. parasagittal, superomedial an den Hirnkonvexitäten, meist bilateral symmetrisch. Es ist eine typische Läsion des Reifgeborenen nach perinataler Asphyxie (Volpe und Pasternak 1977). Ursache ist eine Störung der Hirnperfusion (Ischämie), die insbesondere in den Grenzzonen der Versorgungsgebiete der A. cerebri anterior, media und posterior zu hypoxisch-ischämischen Zellschäden führt (Meyer 1953). Der parietookzipitale Cortex, als Grenzgebiet aller drei großer Hirnarterien, ist deshalb die vulnerabelste Region des Großhirns. Die Ursachen dafür, dass ein Kind bei Ischämie bevorzugt eine parasagittale Hirnschädigung und ein anderes bevorzugt selektive neuronale Nekrose entwickelt, sind nicht bekannt. Es zeigen sich jedoch auch häufig breite Überlappungen dieser beiden Schädigungsformen.

3. 5. 5. Status marmoratus der Basalganglien und des Thalamus

Dies ist die seltenste neuropathologische Form der perinatalen HIE. Obwohl der Insult perinatal auftritt, ist die Vollform der Läsion erst gegen Ende des ersten Lebensjahres ausgebildet. Sie ist morphologisch gekennzeichnet durch Neuronenverlust, Gliose und die charakteristische Hypermyelinisierung, welche der betroffenen Region makroskopisch ein marmorartiges Aussehen verleiht. Am häufigsten betroffen sind Putamen (dorsal), Globus pallidus (dorsal) und der Thalamus (ventral), teilweise auch Cortex-Abschnitte (dann als „Ulegyrien“ bezeichnet). Pathogenetisch scheint der Status marmoratus auf Glutamat-induzierten Zelltod zurückzugehen und die Vulnerabilität der Basalganglien durch die transiente dichte glutamaterge Innervation der Basalganglien in der Perinatalperiode bedingt zu sein (Barks et al. 1988).

3. 5. 6. Fokale und multifokale ischämische Hirnnekrosen

Unter diesem perinatal selteneren Läsionstyp versteht man größere, lokalisierte Nekrosen, die in der Regel im Versorgungsgebiet einer oder mehrerer größerer Hirnarterien auftreten. Sie sind meist durch Durchblutungsstörungen einzelner Hirnarterien bedingt (Embolie, Thrombose, Gefäßmalformation, idiopathisch), seltener durch generalisierte hypoxisch-ischämische Ereignisse. Allerdings bestehen Überlappungen zu den durch generalisierte Hypoxie-Ischämie induzierten Formen,

wie der parasagittalen Hirnschädigung oder der periventrikulären Leukomalazie. Im Gegensatz zur globalen ist bei einer fokalen Ischämie nur ein Teil des Gehirns mangelndurchblutet, und im ischämischen Areal bleibt eine Restperfusion über Kollateralen erhalten (Fölsch et al. 2000). Man unterscheidet hier einen irreversibel geschädigten Infarktkern von einem kritisch durchbluteten, reversibel geschädigten Randbezirk (Penumbra, Ginsberg 1997). Letzterer hat die Potenz - in Abhängigkeit von der Höhe der Durchblutung und der Zeitdauer des Gefäßverschlusses – sich entweder vollständig zu erholen oder irreversibel zu Grunde zu gehen. Neuropathologisch zeigen die Läsionen die Merkmale eines Infarkts mit einer Nekrose aller zellulären Elemente. Die nachfolgenden Ereignisse der Gliareaktion und Abräumung des Infarkts ähneln prinzipiell den Vorgängen bei einer selektiven neuronalen Nekrose (s. o.). Aufgrund der größeren Ausdehnung des Insults kommt es bei perinatalen (multi-)fokalen Hirnnekrosen häufiger zur Höhlenbildung, in Form von „Porencephalie“, „Hydranencephalie“ oder „multizystischer Enzephalopathie“ (Rorke 1992, Schmitt 1984). Ursachen für die Neigung des perinatalen Hirns zur Höhlenbildung nach Infarzierung sind in dem höheren Wassergehalt des Hirngewebes, der relativen Armut an myelinisierten Fasern und der defizitären Astrozytenantwort auf einen Insult zu sehen.

3. 5. 7. Periventrikuläre Leukomalazie (Rezaie und Dean 2002)

Während perinatale Hypoxie-Ischämie bei Reifgeborenen vorzugsweise die Neurone der grauen Substanz schädigt, affiziert sie bei Frühgeborenen die weiße Substanz des Gehirns und ruft typischerweise die periventrikuläre Leukomalazie hervor (Volpe 1995). Diese Läsion ist insbesondere charakteristisch für Frühgeborene, die kardiorespiratorische Störungen erlitten haben und einige Tage überlebt haben (4 bis 10% der vor der 33 bis 35. SSW geborenen Kinder), ist aber bei Reifgeborenen selten. Die PVL ist histopathologisch charakterisiert durch multifokale, oft symmetrische Nekrosen der weißen Substanz in der Nähe der lateralen Ventrikel, kombiniert mit einer diffusen Schädigung der unreifen Oligodendrozyten (Follett et al. 2000). Eine nicht unübliche und gelegentlich schwere Komplikation der PVL ist eine Hämorrhagie in die Läsion (Armstrong und Norman 1974).

Pathogenetisch tragen mehrere Faktoren zur Vulnerabilität der periventrikulären weißen Substanz gegenüber Hypoxie-Ischämie bei:

- periventrikuläre vaskuläre Faktoren: Die periventrikuläre Region stellt beim Frühgeborenen ein Grenz- und Endgebiet der arteriellen Versorgung dar (De Reuck 1984) und ist deshalb besonders anfällig gegenüber Blutdruckabfällen, wie sie im Rahmen perinataler Störungen häufig auftreten.
- die relativ begrenzte vasodilatatorische Kapazität und die relativ aktive anaerobe Glykolyse der perinatalen weißen Substanz: Bei Ischämie überfordert der hohe Glucosebedarf die Versorgungsmöglichkeiten (Glauser et al. 1990).
- die hohe Vulnerabilität der unreifen Oligodendrozyten gegenüber verschiedenen Noxen wie Glucose- und Sauerstoffmangel, freie Radikale, fehlende trophische Stimuli, proinflammatorische Zytokine, sowie gegenüber Glutamat (Oka und Belliveau 1993, Rorke 1982, Rorke 1992).

Durch Glutamat-bedingte Exzitotoxizität infolge Hypoxie-Ischämie werden also nicht nur Neurone, sondern auch die unreife weiße Substanz zerstört (Follett et al. 2000, Johnston 2001a). Als Mechanismen des exzitotoxischen Zelltods unreifer Oligodendrozyten werden sowohl ein rezeptorvermittelter, als auch ein nicht-rezeptorvermittelter angeführt:

- die Triggerung einer toxischen Kaskade durch Non-NMDA-Typ-Glutamat-Rezeptoren, z.B. AMPA (Follett et al. 2000, Johnston et al. 2001a, McDonald und Johnston 1990)
- die Senkung des intrazellulären Zysteinspiegels durch einen Glutamat-Zystein-Austauscher: Der Zysteinmangel führt zum Abfall des intrazellulären Glutathionspiegels, einem wichtigen Schutzmechanismus gegen freie Radikale, so dass die Oligodendroglia radikalvermittelt geschädigt wird (Bast et al. 1991, Meister und Anderson 1983, Oka und Belliveau 1993).

Die relative Verschonung des zerebralen Cortex und der subkortikalen weißen Substanz des Frühgeborenen bei Hypoxie-Ischämie ist bedingt durch die für das fetale Gehirn charakteristischen, vielen meningealen Anastomosen zwischen der A. cerebri anterior, media und posterior, welche sich erst kurz vor Ende der Gestationszeit zurückbilden (De Reuck 1984, Rorke 1992, Van der Eecken 1959).

Der Zeitraum der größten Empfindlichkeit für PVL ist beim menschlichen Hirn zwischen der 24. und 32. Schwangerschaftswoche, wenn die periventrikuläre weiße Substanz vorwiegend durch proliferierende und differenzierende Oligodendrozytenvorläufer besiedelt wird, also vor der eigentlichen Synthese der Myelinscheiden (Back et al. 2001, Follett et al. 2000, Kinney und Back 1998). Der Untergang der Oligodendrozytenvorläufer im Falle einer Schädigung wird meist als apoptotisch beschrieben (Du Plessis und Volpe 2002, Skoff et al. 2001). Die Schädigung dieser Zellen äußert sich dann in der ausbleibenden schnellen perinatalen Myelinisierung ab der 32. SSW (Du Plessis und Volpe 2002). Nach der 32. SSW ist das Hirn mit reifen, myelinisierenden, MBP-exprimierenden Oligodendrozyten besiedelt, welche weniger empfindlich gegenüber Noxen, wie Exzitotoxizität sind (Fern und Moller 2000).

3. 6. Therapieansätze der hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie

Neben der Asphyxieprävention stehen für das Management der perinatalen HIE zur Zeit im wesentlichen nur symptomatische Maßnahmen zur Verfügung. Diese haben die Aufrechterhaltung einer adäquaten Ventilation, zerebrovaskulären Perfusion und Blutglucosespiegels, sowie die Behandlung von Komplikationen (Anfälle, Hirnödem) zum Ziel.

Abgesehen von diesen allgemeinen Maßnahmen wird schon seit geraumer Zeit versucht, auf der Grundlage der bekannten Elemente der Hypoxie-/Ischämie-induzierten pathophysiologischen Kaskaden spezifische neuroprotektive Therapieansätze zu entwickeln (Legido et al. 2000, Peeters und van Bel 2001). Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass sich ein Teil des Neuronenuntergangs nach Hypoxie-Ischämie mit einer gewissen Latenz bis zu 72 Stunden nach Insult vollzieht („therapeutisches Fenster“). Ziel der Interventionen sind also die Neurone, die nach dem primären Insult noch leben, aber durch verzögertes Energieversagen zugrunde gehen werden.

Für eine Vielzahl von Substanzen konnten in den vergangenen Jahren in tierexperimentellen Modellen neuroprotektive Effekte nach Hypoxie/Ischämie nachgewiesen werden. Nachfolgend einige Beispiel mit Angabe des vermuteten neuroprotektiven Mechanismus:

- Phenobarbital (Michenfelder et al. 1976): Reduktion des Hirnstoffwechsels und des zerebralen Sauerstoffverbrauchs
- Magnesiumsulfat (McDonald et al. 1990): natürlicher NDMA-Rezeptor-Antagonist, der den neuronalen Kalzium-Influx hemmt
- Allopurinol (Palmer et al. 1990): Hemmung der Xanthinoxidase und somit reduzierte Bildung freier Radikale bei Hypoxie-Ischämie
- Flunarizin (Silverstein et al. 1986b): Kalziumkanalblocker, der den Kalzium-Einstrom bei Hypoxie/Ischämie hemmt und den zerebralen Blutfluss erhöht
- induzierte systemische Hypothermie oder selektive Kopfkühlung: Sie wirkt auf mehreren Ebenen. Sie reduziert den zerebralen Sauerstoff- und Energieverbrauch, hemmt die extrazelluläre Akkumulation von Glutamat, die Freisetzung zytotoxischer Zytokine, die Aktivität freier Radikale und den verzögerten Zelltod durch Apoptose (Thoresen et al. 1995, Wagner et al. 1999).

- Vitamin C (Tan und Zhou 1997): wichtiges Antioxidans und Neuromodulator, der die Glutamatbindung an NMDA-Rezeptor hemmt
- Vitamin E (Stohrer et al. 1998): wichtiges Antioxidans, das die radikalbedingte Lipidperoxidationskette unterbricht
- NMDA-Rezeptor-Antagonisten (1): MK-801 (Ford et al. 1989, Hattori et al. 1989, McDonald et al. 1987), Dextromethorphan (Laroia et al. 1997), Ketamin (Spandou et al. 1999)
- Wachstumsfaktoren: Nerve growth factor (Holtzman et al. 1996), Insulin-like growth factor-1 (Johnston et al. 1996), Wachstumshormon (Gustafson et al. 1999)
- Pan-Caspase-Inhibitoren (Cheng et al. 1998): Hemmung der Apoptose

Doch nur wenige von diesen Ansätzen wurden bis jetzt in klinischen Studien getestet: Phenobarbital (Hall et al. 1998), Magnesiumsulfat (Nelson und Grether 1995), Allopurinol (van Bel et al. 1971), Flunarizin (Franke et al. 1996), Vitamin C (Bass et al. 1998) und Hypothermie (Azzopardi et al. 2000, Battin et al. 2001, Wagner et al. 1999). Ein konsistenter, signifikanter Benefit für die behandelten Kinder konnte in diesen Studien bis jetzt noch nicht nachgewiesen werden. Desweiteren muss beachtet werden, dass die klinische Anwendbarkeit einer Therapieform auch durch die begleitenden Nebenwirkungen limitiert wird. So sind beim Einsatz der systemischen Hypothermie die mit sinkender Körpertemperatur steigenden mannigfaltigen Risiken zu beachten wie: kardiale Arrhythmien, erhöhte Blutviskosität, Gerinnungsstörungen, Plättchendysfunktion und die verminderte Sauerstoffverfügbarkeit (Wagner et al. 1999). Magnesiumsulfat führte in klinischen Studien zu schwerer Hypotension (Levene et al. 1995).

Ein erfolgversprechenderer Weg ist dagegen die Kombination mehrerer der erwähnten Therapieansätze. Denn durch den Einsatz von Substanzen mit synergistischen Effekten auf unterschiedlichen Ebenen können niedrigere Dosen gewählt werden und dadurch das Nutzen-Risiko-Verhältnis verbessert werden (Lyden und Lonzo 1994, Stuiver et al. 1996). Zum Beispiel könnte induzierte Hypothermie das therapeutische Fenster „öffnen“ (verlängern), in dem andere neuroprotektive Substanzen ihren Effekt entfalten können (Guan et al. 2000).

3. 7. Topiramat

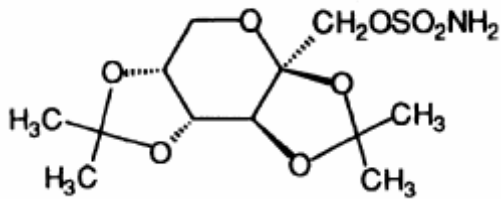


Abb. 2: Strukturformel von Topiramat

2,3:4,5-bis-O-(1-methylethyliden)-β-d-fructopyranosyl-sulfamat (MW 339)

Topiramat ist es ein Sulfamat-substituiertes D-Fructose-Derivat und unterscheidet sich damit strukturell von anderen Antiepileptika. Es ist in Deutschland für Erwachsene und Kinder ab 2 Jahren zugelassen zur Monotherapie von Epilepsien (jeglicher Anfallsart), sowie zur Zusatztherapie bei fokalen epileptischen Anfällen mit oder ohne sekundärer Generalisierung, bei primär generalisierten tonisch-klonischen Anfällen und bei epileptischen Anfällen beim Lennox-Gastaut-Syndrom (Angehagen et al. 2003, Fachinformation zu Topamax[®]). Für TPM konnten verschiedene Wirkungsmechanismen nachgewiesen werden, die zur antiepileptischen Wirkung beitragen könnten (Poulsen et al. 2004, Shank et al. 2000):

- negativ modulatorische Wirkung auf spannungsaktivierte Natrium- und Kalzium-Kanäle
- negativ modulatorische Wirkung auf Glutamatrezeptoren vom AMPA/Kainat-Typ (verminderter Natrium- und Kalzium-Einstrom)
- modulatorische Wirkung auf GABA_A-Rezeptoren (Verstärkung des Chlorid-Einstroms)
- Hemmung der Carboanhydrase (Subtypen CA-II und CA-IV)

Aus diesem Wirkungsspektrum lässt sich die theoretische Möglichkeit der Beeinflussung der neurotoxischen Kaskade nach Hypoxie-Ischämie durch Topiramat ableiten. Tatsächlich ergaben sich in den vergangenen Jahren in verschiedenen Untersuchungen an Nagern Hinweise auf eine neuroprotektive Wirkung von Topiramat bei Applikation nach hypoxisch-ischämischem Insult (Lee et al. 2000, Liu et al. 2004, Yang et al. 1998). In-vivo-Untersuchungen an Säugern fehlten bisher zu dieser Fragestellung.

Aus diesem Grund entwickelten wir ein Hypoxie-Ischämie-Modell am neugeborenen Ferkel zur Untersuchung möglicher neuroprotektiver Effekte von Topiramat bei Applikation nach Insult. Denn der Reifegrad neugeborener Ferkel ist ähnlich dem des Menschen zum Zeitpunkt der Geburt (Dobbing und Sands 1979). Desweiteren ähneln sich die Hirnmorphologie, zerebrovaskuläre Eigenschaften und die zerebrale Stoffwechselaktivität dieser beiden Spezies (Armstead 2000, Raju 1992).

3. 8. Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die histopathologischen Folgen einer hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung bei neugeborenen Ferkeln zu untersuchen. Unter Zuhilfenahme verschiedener Färbetechniken sollte das Ausmaß nekrotischer und apoptotischer Zelluntergänge 68 Stunden nach Insult quantifiziert werden. Desweiteren wurden die Effekte der Gabe des vermutet neuroprotektiven Topiramats nach hypoxisch-ischämischer Schädigung eruiert unter Berücksichtigung der Auswirkungen auf Apoptose und Nekrose. Die Testung von Topiramat erfolgte in zwei Dosierungen, um mögliche dosisabhängige Effekte zu verifizieren, um eine für Säuger geeignete Dosis zu finden (bisher nur Versuche an Nagern) und um eventuelle toxische Effekte höherer Dosierungen nachzuweisen. In diesem Kontext wurden die Schäden der weißen Substanz durch immunhistochemische Färbung von myelinbasischem Protein als Marker für Myelin- und oligodendrogliale Schäden beurteilt. Im pathophysiologischen Teil des Experiments wurde überprüft ob durch die Applikation von Topiramat nach erfolgter Hypoxie-Ischämie eine Reduktion der Anfallshäufigkeit, eine Verbesserung des neurologischen Outcomes und der Überlebensrate ermöglicht wird. Die Ergebnisse der neurologischen Untersuchung der Versuchstiere wurden mit den histopathologischen verglichen, um die Validität des gewählten Neuroscores zu beurteilen.

4. METHODIK

4. 1. Allgemeines

Die vorliegende Arbeit ist Teil einer tierexperimentellen Studie, die in Zusammenarbeit des Instituts für Pathophysiologie (Nonnenplan 2, 07740 Jena) und der Neuropädiatrie (Kochstraße 2, 07743 Jena), teils gestützt durch die „Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development“, durchgeführt wurde. Die vorliegende Promotionsarbeit umfasst die neuropathologische Aufarbeitung und Auswertung der Gehirne der Versuchstiere. Sie wurde am Institut für Pathologie (Ziegelmühlenweg 1, 07737 Jena) durchgeführt.

4. 2. Herkunft der Tiere und Versuchsgruppen

Für diese Studie wurden 32 gesunde, weibliche, neugeborene Ferkel im Alter von zwei bis fünf Tagen mit einem Körpergewicht von 1984 g \pm 233 g benutzt. Die Versuchstiere wurden von der Erzeuger-Genossenschaft Kleinschwabhausen e.G. (Dorfstraße 54b, 99441 Lehnstedt) bezogen. Alle durchgeführten chirurgischen und experimentellen Verfahren sind vom Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz gebilligt worden. Zuvor hatte die Tierethikkommission der FSU ein positives Votum abgegeben. Das Experiment war orientiert an früheren Studien, die ein etabliertes Model für Hypoxie-Ischämie benutzten (LeBlanc et al. 1990, LeBlanc et al. 1991, Thoresen et al. 1995).

Unmittelbar nach der Geburt wurde die Lebensfähigkeit der neugeborenen Ferkel anhand eines etablierten Scores (De Roth und Downie 1976) beurteilt, und nur solche mit einem Lebensfähigkeitsscore ≥ 7 wurden in die Studie aufgenommen.

Die Versuchstiere wurden zufällig in vier Gruppen zu jeweils 8 Ferkeln eingeteilt.

- Die Kontroll-Tiere (**Kontrolle**) wurden anästhesiert und operiert, jedoch keiner Hypoxie-Ischämie unterzogen. Sie dienten als Kontrolle, um den operationsbedingten Anteil an beobachteten Effekten zu evaluieren.
- Die zweite Gruppe (**HI**) wurde nach Anästhesie einer Hypoxie-Ischämie unterzogen. Eine Stunde nach dem Insult und an den folgenden Tagen zweimal pro Tag wurde ihnen 0,9-prozentige NaCl-Lösung intravenös injiziert in Flüssigkeitsvolumina, die denen der Behandlungsgruppen äquivalent waren.

- Topiramat wurde in zwei Dosierungen getestet: Eine Gruppe (**HI-TPM10**) wurde eine Stunde nach der Hypoxie-Ischämie mit einer einmaligen intravenösen Sättigungsdosis von gelöstem Topiramat von 20 mg/kg Körpergewicht behandelt. Die Erhaltungsdosis war 10 mg/kg/d Topiramat in zwei Gaben an den folgenden Tagen.
- Die zweite Behandlungsgruppe (**HI-TPM20**) erhielt eine einmalige Sättigungsdosis von 50 mg/kg und eine Erhaltungsdosis von 20 mg/kg/d in zwei Gaben pro Tag.

Topiramat wurde von „Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development“ als Pulver zur Verfügung gestellt. Vor jedem Experiment wurde eine Lösung in PBS (phosphate buffered saline) entsprechend den Anweisungen des Herstellers erzeugt.

Die folgende Tabelle (Tab. 1) zeigt die zufällige Aufteilung der Tiere auf die Versuchsgruppen. Die Bezeichnungen ergaben sich aus der fortlaufenden Nummerierung aller in das Labor aufgenommenen Versuchstiere.

Tab. 1: Aufteilung der Tiere auf die Versuchsgruppen

Nummer	Kontrolle	HI	HI-TPM10	HI-TPM20
1	718	726	742	745
2	724	729	744	747
3	730	734	774	750
4	769	751	781	780
5	785	776	784	782
6	792	789	787	783
7	797	795	790	788
8	798	800	793	801

4. 3. Anästhesie und operative Vorbereitungen

Die Narkose wurde mit 2,5% Isofluran in 70% Lachgas und 30% Sauerstoff über eine Maske eingeleitet. Während der Operation wurde die Narkose mit 0,8% Isofluran aufrechterhalten. In ein oberflächliches Blutgefäß des Ohres wurde ein Katheter für die Medikamentenapplikation und Volumensubstitution (Ringerlactat-Lösung 5 ml/kg/h) eingeführt. Anschließend erfolgte eine endotracheale Intubation, Relaxation mit Pancuroniumbromid (0,2 mg/kg KG/h i.v.) und Beatmung (Servo Ventilator 900C, Siemens-Elema, Schweden) zur Aufrechterhaltung normoxischer und normokapnischer Blutgaswerte. Die Körpertemperatur wurde mit einem rektalen Sensor überwacht und mit Hilfe eines Heizkissens und einer Feedback-kontrollierten Heizlampe auf einem konstanten Niveau von $38\pm 0,3^{\circ}\text{C}$ gehalten. Die Hautinzisionen wurden nach subkutaner Injektion eines Lokalanästhetikums vorgenommen (Xylocitin 2%, Jenapharm Jena, Deutschland). Um beide Aa. carotis communes wurden aufblasbare Gefäßokkluder gelegt (Docxs Biomedical Products and Accessories Ukiah, CA, USA). Nach Inzision in der Bauchwandmittellinie wurde durch beide Nabelarterien jeweils ein Polyurethan-Katheter (PU 3,5 Ch, Sherwood, England) in die Bauchaorta vorgeschoben. Hierüber wurde Blut für Blutgas- und pH-Wert-Analysen entnommen, der arterielle Blutdruck überwacht, sowie während der Hypoxie-Ischämie-Phase Blut entzogen, um den mittleren arteriellen Blutdruck unter die Autoregulationsgrenze von 40 mmHg zu senken. Die Katheter wurden subkutan zur linken Flanke vorgeschoben und nach Ausleitung durch eine kleine Hautinzision fixiert. Anschließend erfolgten vier Inzisionen der Kopfschwarte im Abstand 1 cm von der Mittellinie: zwei 15 mm rostral und zwei 10 mm kaudal vom äußeren Gehörgang. Hier wurden Schraubelektroden in den Schädel gedreht für die Ableitung eines unipolaren Elektrokortikogramms (ECoG) vom frontalen und okzipitalen Cortex. Die Referenzelektrode wurde am Nasion angelegt. Die ECoG-Signale wurden verstärkt, gefiltert (Zeitkonstante war 0,3 Sekunden, Cut-off-Frequenz war 100 Hz), in einen PC mittels eines 16-Kanal-A/D-Boards (Data Translation, DT2821, Marlboro, MA) eingespeist und auf Festplatte für die spätere off-line Datenanalyse gespeichert (Sample-Rate war 125 Hz).

4. 4. Akute zerebrale Hypoxie-Ischämie

Nach Abschluss der operativen Vorbereitungen, wurde die Anästhesie auf 0.25% Isofluran in 70% Lachgas und 30% Sauerstoff reduziert und die Ferkel konnten sich eine Stunde lang erholen. Nach Beobachtung stabiler Ausgangsverhältnisse für eine Stunde wurde bei den Ferkeln der Gruppen HI, HI-TPM10 und HI-TPM20 ein hypoxisch-ischämischer Insult gesetzt, indem die Karotisokkluder beidseits aufgeblasen wurden. Gleichzeitig wurde aus der arteriellen Kanüle Blut in eine heparinisierte 50ml-Spritze gezogen, um den mittleren Blutdruck auf ungefähr 40 mmHg zu senken und ihn auf diesem Niveau 30 min lang zu halten (28-minütige Ischämie). Nach 15 Minuten wurde zusätzlich für 13 Minuten die inspiratorische Sauerstoff-Fraktion (FiO_2) von 0.35 auf 0.06 gesenkt. Erfolgreiche Hypoxie-Ischämie wurde definiert als eine Reduktion der ECoG-Aktivität um mehr als 85% verglichen zum Ausgangsaktivität für mindestens 20 Minuten, in Anlehnung an frühere Studien (Armstead 2000, Raju 1992).

Nach einer Experimentierzeit von 28 Minuten, d. h. nach 15 Minuten Ischämie und 13 Minuten zusätzlicher Hypoxie, wurden die Karotisokkluder abgelassen, das zuvor entnommene Blut reinfundiert und 30 Minuten lang reiner Sauerstoff verabreicht. Anschließend wurden die Tiere von der Beatmung entwöhnt und extubiert, sobald die Spontanatmung wieder auftrat.

Eine Stunde nach dem Experiment erhielten HI-TPM10 und HI-TPM20 die Sättigungsdosis Topiramat über den arteriellen Zugang, wogegen HI und Kontrolle dasselbe Volumen 0.9% Salzlösung erhielten.

4. 5. Nachbeobachtungsphase

Während der folgenden Beobachtungsperiode wurden die Ferkel in einem Käfig gehalten, der durch eine Heizlampe gewärmt wurde. Alle 6 Stunden wurden sie mit künstlicher Ferkelnahrung gefüttert. Die HI-Gruppe und die Behandlungsgruppen erhielten 24 h, 36 h, 48 h und 60 h nach Experimentbeginn ihre entsprechende NaCl-Lösung bzw. TPM-Lösung als Injektion in einem äquivalenten Volumen.

Es erfolgte eine Messung physiologischer Parameter (rektale Temperatur, arterieller Blutdruck, arterieller pCO_2 , arterieller pO_2 , arterielle O_2 -Konzentration, arterielle Glucosekonzentration, arterielle Laktatkonzentration, arterieller pH, arterielle Hämoglobinkonzentration) zu folgenden Zeitpunkten: vor der Hypoxie-Ischämie (Baseline), während der Hypoxie-Ischämie, 5 min nach Experimentende, 30 min

nach Experimentende und an den folgenden Tagen jeweils zwei mal pro Tag. Blut-pH, pCO₂ und pO₂ wurden mit einem Blutgasanalysator gemessen (Model ABL50, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark); Bluthämoglobin und die Sauerstoffsättigung mit einem Hämoximeter (Model OSM3, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark). Blutglukose und -laktat wurden mit einem Elektrolyt-Metabolit-Laboratorium bestimmt (EML105, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) und entsprechend der Körpertemperatur des Tieres zum Entnahmezeitpunkt korrigiert.

Auffälligkeiten im Verhalten und auftretende Anfällen wurden tagsüber durch klinische Beobachtung und nachts durch achtstündiges Videomonitoring registriert. Viermal am Tag erfolgte eine ECoG-Aufzeichnung und zweimal am Tag eine neurologische Untersuchung der Tiere. Der untersuchende Neuropädiater war für die Untersuchungsgruppen verblindet. Die neurologischen Ergebnisse wurden auf einer Skala von 10 bis 37 bewertet (siehe Tab. 2), wobei 37 normal war, entsprechend einem adaptierten Standard-Scoring-System für Ferkel (LeBlanc et al. 1990, Brambrink et al. 1999). Die Anfallsaktivität wurde nach dem in Tabelle 3 gezeigten Punktesystem bewertet.

Tab. 2: Neuroscore

Neurologisches Kriterium	Subkriterium	Score
Vigilanz	Geistiger Zustand	1 - 4
	Verhalten	1 - 4
Hirnnerven	Pupillen	1 - 3
	Okulo-vestibulärer Reflex	1 - 3
Reflexe	Schreitreflex	1 - 3
	Nackenstellreflex	1 - 3
Motorik	Tonus	1 - 4
	Stehen	1 - 4
Koordination	Laufen	1 - 4
	Fressverhalten	1 - 5
	Total	10 - 37

Tab. 3: Anfalls-Score

Punktzahl	Anzahl der Anfälle
0	keine
1	1 - 3
3	> 3

68 Stunden nach Experimentende wurden die Ferkel wieder narkotisiert, künstlich beatmet und für die Hirnperfusion vorbereitet. Beide Aa. brachiales wurden katheterisiert, der Thorax eröffnet und die Aorta descendens knapp über dem Zwerchfell abgeklemmt. Nach Eröffnung des rechten Vorhofohres erfolgte eine intrakardiale Infusion von 4 ml KCl mit 100 IE Heparin zur Erzeugung eines Herzstillstandes. Anschließend wurde das Gehirn zunächst mit warmer 0,9% NaCl-Lösung und dann mit gepuffertem 4% Formalin perfundiert. Die Schädel wurden in toto abgetrennt und für eine Woche in Formalin eingelegt. Nach diesem Zeitraum wurden die Gehirne entnommen und in Formalin für die spätere pathologische Untersuchung aufbewahrt.

4. 6. Histopathologische Aufarbeitung

Die Gehirne wurden im Institut für Pathophysiologie aus dem Schädel präpariert, anschließend gewogen, photographiert und in 10 bis 11 ca. 7 mm starke, koronar verlaufende Scheiben geschnitten. Die Gewebsscheiben wurden im Institut für Pathologie in Paraffin eingebettet. Mit dem Microtom (MICROM HM 335 E) wurden von ihnen 5µm dicke Gewebsschnitte angefertigt, die auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger gebracht wurden. Anschließend erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) sowie die immunhistochemische und weitere Bearbeitung.

4. 6. 1. HE-Färbung

Für die HE-Färbung wurden die benötigten Objektträger in heiße Chromalaun-Gelatine-Lösung getaucht und über Nacht getrocknet. Anschließend wurden die Gewebsschnitte aufgebracht. Vor der Färbung erfolgte eine Entparaffinierung mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe (erst 20 min in Xylol, dann 100%, 100%, 96%, 96%, 70% Ethanol, dann Aqua dest.). Anschließend wurde 10 – 20 Minuten mit Hämaun gefärbt, dann mit Leitungswasser gespült und 7 Minuten gebläut. Nun erfolgte eine 2-3 minütige Färbung mit Eosin. Schließlich wurde der Schnitt in einer aufsteigenden Alkoholreihe (entgegengesetzt zu oben) bis zum Xylol überführt und dann in Balsam eingedeckt.

4. 6. 2. Immunhistochemische Färbung von MBP

Das myelinbasiische Protein

Das myelinbasiische Protein (MBP) ist ein wichtiges Strukturprotein der Markscheiden und macht mehr als 25% des gesamten Myelins des ZNS aus (McLaurin und Young 1995). Es ist intrazellulär lokalisiert an der zytoplasmatischen Seite der elektronenmikroskopisch sichtbaren dichten Hauptlinie der Markscheiden. Neben seiner strukturellen Bedeutung spielt es eine Rolle in der Myelinogenese, indem es bei der Aneinanderlagerung der Myelinscheiden mitwirkt (Pedraza et al. 1997). Die immunhistochemische Darstellung von MBP wurde in der Vergangenheit zum Nachweis von Schädigungen der weißen Substanz nach hypoxisch-ischämischem Insult in verschiedenen Tiermodellen angewandt, z. B. bei Ratten (Liu et al. 2002, Follett et al. 2004) und bei fetalen Lämmern (Petersson et al. 2002). Im Rahmen einer hypoxisch-ischämischen Schädigung werden verschiedene Proteasen, wie z.B. Calpain, aktiviert, die zum Abbau von Myelinproteinen wie MBP führen (Liu et al. 2002), so dass das Hirngewebe hypoxisch-ischämisch geschädigter Tiere eine geringere MBP-Anfärbbarkeit aufweist. Desweiteren wurden erhöhte Liquorkonzentrationen von MBP als Marker für Myelinschäden bei intrakraniellen Tumoren (Matias-Guiu et al. 1986), akuten zerebralen Infarkten (Matias-Guiu et al. 1986), nach perinataler Asphyxie (Garcia-Alix et al. 1994) und bei multipler Sklerose nachgewiesen.

Allgemeine Vorbereitungen

Die Darstellung von MBP in den Hirnschnitten der Versuchstiere erfolgte mittels immunhistochemischer Färbung nach der ABC-Methode. Dafür wurden silanisierte Objektträger verwendet (Silanisierung: 3 min Eintauchen des Objektträgers in 5% Silane-Lösung, Spülen mit Aceton, 24 h trocknen bei 45°C). Die Gewebeschnitte wurden zunächst 24 Stunden bei 45°C, dann 30 Minuten bei 60°C inkubiert. Die Entparaffinierung erfolgte hier mit einer Acetonreihe (erst 20 min in Xylol, dann 2 mal Xylol, dann 4 mal Aceton, dann 1/3 Leitungswasser in Aceton, dann 2/3 Leitungswasser in Aceton, dann Leitungswasser). Anschließend wurde 3 mal 5 Minuten mit PBS-Puffer gespült.

ABC-Methode (Hsu und Raine 1981, Hsu et al. 1981)

Die **Avidin-Biotin-Complex-Methode** nutzt die sehr hohe Bindungsaffinität des Avidins zu Biotin aus. Avidin besitzt vier Bindungsplätze für Biotin. Viele Proteine können wiederum mit Biotin konjugiert werden. Durch Vermischung von Avidin mit biotinylierter Peroxidase entsteht ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex, welcher mindestens noch eine Bindungsstelle für Biotin besitzt. Über letztere kann der Komplex dann an einen biotinylierten Antikörper binden und ihn somit durch die Peroxidasereaktion lichtmikroskopisch darstellbar machen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung mittels der Vectastain-Elite-ABC-Peroxidase-Methode (nach Hicks et al. 1995) angewendet. Zu Beginn wurde die endogene Peroxidase in den Gewebeschnitte mit 0,3% H₂O₂ in PBS-Puffer geblockt (30 Minuten bei Raumtemperatur). Danach wurden unspezifische Aldehydgruppen mit 50 mg Natrium-Borhydrit auf 100 ml Aqua destillata für 25 Minuten inhibiert. Nach Spülen mit PBS-Puffer (3 mal 5 min) erfolgte die Inkubation mit PBS-Plus (PBS; 0,1% Triton; 3% Normalserum) bei 37°C für 30 Minuten. Durch das Normal-Goat-Serum erfolgte die Blockierung unspezifischer Antigene. Anschließend wurden die Gewebsschnitte über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert (polyklonaler Kaninchen-MBP-AK, IgG; Dako Diagnostika GmbH, Hamburg; Verdünnung 1:200). Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnitte nach Spülen mit PBS (3 mal 15 min) mit PBS-Plus bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären biotinylierten Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 für 2 Stunden bei 37°C. Hierauf folgend wurde nach zweimaligem Spülen mit PBS der Avidin-Biotin-Complex (ABC) mit einer Einwirkzeit von einer Stunde bei 37°C auf die Gewebeschnitte aufgetragen (Vectastain-Elite-ABC-Reagenz der Firma Camon, welcher bereits dreißig Minuten vorher angesetzt wurde; Reagenz A und Reagenz B jeweils 1:100 in PBS-Puffer). Die Schnitte wurden danach dreimal mit PBS gespült und anschließend 6 Minuten mit dem Peroxidase-Substrat (DAB = 3,3-Diamino-Benzidin-Tetrahydrochlorid) inkubiert. Als Peroxidase-Substrat wurden DAB-Chromogen-Tabletten und Substratlösung aus dem ICA-Kit (Abbott Laboratories) verwendet. Die Reaktion wurde mit Aqua destillata unterbrochen, anschließend wurde mit Hämatoxylin gegengefärbt (Einwirkzeit von 15 Minuten). Nach Dehydrierung der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe wurden die Gewebeschnitte mit Deckmedium (Glycerol gelatin, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) eingedeckt.

4. 6. 3. TUNEL-Methode

Die genomische DNA kann während des Apoptoseprozesses sowohl in niedermolekulare DNA-Doppelstrangfragmente (Mono-/ Oligonukleosomen) als auch in Einzelstränge ('nicks') höheren Molekulargewichts zerbrechen. Solche DNA-Strangbrüche können in einer enzymatischen Reaktion durch die Markierung freier 3'-OH-Enden mittels modifizierter Nukleotide identifiziert werden (Brodhun et al. 2001). Bei dem verwendeten Kit ("in situ cell death detection kit", Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) wird das Enzym Terminale-Desoxinukleotidyl-Transferase (TdT) genutzt, welches die Polymerisation von Nukleotiden (in diesem Fall Flurescein-konjugierte-Digoxigenin-UTP) an freien 3'-OH-DNA-Enden katalysiert, um DNA-Strangbrüche nachzuweisen (TUNEL = TdT-mediated dUTP nick end labeling). Während der TUNEL-Reaktion werden mit Hilfe der Terminalen Desoxinukleotidyl-Transferase Flurescein-konjugierte dUTP-Nukleotide als Antigen an die fragmentierte DNA angelagert. Für die Passage der Antikörper in den Zellkern ist jedoch zuvor eine Vorbehandlung mit proteolytischen Enzymen, wie Proteinase K (10-20µg/ml in Tris/HCl, 200ml pro Schnitt), notwendig. Dieser Vorgang wird nach 20 minütiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C durch dreimaliges Spülen mit PBS beendet. Für die TUNEL-Reaktion trägt man je nach Größe der Gewebeproben bis zu 100 ml Flureszein-konjugierte-d-UTP und die Terminale-Desoxinukleotidyl-Transferase in der vom Hersteller vorgegebenen Verdünnungslösung 9:1 auf und lässt diese für 1 Stunde bei 37°C inkubieren. Für die Negativkontrolle wird nur die reine Verdünnungslösung (Flureszein-konjugierte-d-UTP ohne Enzym) aufgetragen. Die TUNEL-Reaktion wird durch dreimaliges Spülen mit PBS beendet. Für die lichtmikroskopische Darstellung lässt man in einem zweiten Schritt den „Primärantikörper“ mit einem Anti-Fluoreszein-Sekundärantikörper, der mit Alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert ist, reagieren. Da es sich bei der alkalischen Phosphatase um ein ubiquitär vorkommendes Enzym handelt, muss die endogene AP vorher inhibiert werden (mit Magermilchpulver oder Kaninchenserum für 60 Minuten). Nach Zusatz eines Substrates für die Alkalische Phosphatase kann man die markierten Zellen unter einem Lichtmikroskop analysieren. Ohne zu spülen, wird dazu anschließend die Converter-AP aufgetragen und bei 37°C 30 Minuten lang inkubiert. Der Entwicklungsprozess wird mit NBT/BCIP Blockierungslösung (Boehringer Mannheim) beendet. Nach reichlichem Waschen der Gewebsschnitte erfolgt die Gegenfärbung mit Kernechtrot. Nach erneutem Spülen können die

Schnitte mit Glyceringelatine eingedeckt werden. Als Positivkontrolle dienten humane Lymphomschnitte.

4. 7. Histopathologische Auswertung

Die Gewebeschnitte wurden zunächst ohne Kenntnis über die Zugehörigkeit zur jeweiligen Versuchsgruppe ausgewertet.

4. 7. 1. HE-Auswertung

Die HE-Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Carl-Zeiss-Mikroskop) mit 160facher Vergrößerung. Es wurden insbesondere folgende Regionen bezüglich ihres hypoxisch-ischämischen Nervenzellschadens beurteilt: frontaler, parietotemporaler und occipitaler Cortex; Basalganglien, Thalamus, Hippocampus, Kleinhirn, Hirnstamm. Dabei erfolgte eine Bewertung des Schadens nach folgendem Score (Tab. 3), in Anlehnung an frühere Studien (Cataltepe et al. 1995, Foster et al. 2001, LeBlanc et al. 1990, Thoresen et al. 1996, Wirrell et al. 2001).

Tab. 4: Hypoxie-Ischämie-Score

Hypoxie-Ischämie-Score	Nervenzellschaden
0	keine nekrotischen Nervenzellen
1	bis 10% nekrotische Nervenzellen
2	10 bis 30% nekrotische Nervenzellen
3	30 bis 50% nekrotische Nervenzellen
4	mehr als 50% nekrotische Nervenzellen

Als nekrotisch wurden Nervenzellen gewertet, die durch ein intensiv eosinophiles Zytoplasma und Verlust der Kernmembranintegrität (Karyolyse) gekennzeichnet waren (Yue et al. 1997). Diese Merkmale werden als typisch für Nekrose betrachtet (Majno und Joris 1995) und wurden nach ischämischen Insulten sowohl bei Menschen und Versuchstieren beschrieben (Garcia 1978, Li et al. 1995). Es wurde der komplette Schnitt zunächst durchgemustert und die Regionen mit dem größten Schadensausmaß ausgemacht. Dort wurden dann seitengesondert pro Region jeweils 5 Gesichtsfelder nach obigem Schema ausgezählt und aus diesen 5 Werten das arithmetische Mittel (gerundet auf 0,5) gebildet.

4. 7. 2. Quantifizierung der Immunhistochemie

Zur Quantifizierung der Immunhistochemie wurden die entsprechenden Gewebeschnitte mit einem Scanner (CanoScan LIDE 50) in einen Computer eingescannt. Für die untersuchten Regionen wurden Grauwerte (Dichte) zwischen 0 (weiß) und 255 (schwarz) mit einem Bildbearbeitungsprogramm (Scion-Image, Version 4.0.2) bestimmt. Die Fläche des Objektträgers wurde für den Weißabgleich benutzt, um den Einfluss der Hintergrundmarkierung als mögliche Fehlerquelle bei der digitalen Auswertung zu eliminieren. Es wurden folgende Hirnregionen bezüglich ihrer MBP-Anfärbbarkeit untersucht: frontale weiße Substanz, temporoparietale weiße Substanz, Striatum, Hippocampus, Kleinhirn und Hirnstamm.

4. 7. 3. Quantifizierung der TUNEL-Färbung

Inselcortex, Gyrus cinguli, Corpus callosum, Nucleus caudatus, Subventrikulärzone und die frontale weiße Substanz wurden auf Anwesenheit, Anzahl und Verteilung TUNEL-positiver Zellen untersucht. Die Gewebsschnitte wurden unter 200facher Vergrößerung betrachtet (Fläche $1,5\text{mm}^2$ pro Gesichtsfeld). Da DNA-Schäden sowohl apoptotischer als auch nekrotischer Natur sein können (Newcomb et al. 1999), war eine genaue morphologische Untersuchung der TUNEL-positiven Zellen erforderlich. Als Orientierung diente die Unterscheidung TUNEL-positiver Zellen in Typ-I- und II-Zellen nach Rink et al. (Rink et al. 1995). TUNEL-positive Zellen, die mit dem morphologischen Bild von Kernschrumpfung, Chromatinmargination und der Ausbildung von 'apoptotic bodies' einher gingen, wurden den Typ-II-Zellen zugeordnet. Bei diesen Zellen nimmt man an, dass es sich um Apoptosen handelt. Im Gegensatz dazu wurden Zellen, die geschwollen erschienen und eine diffuse homogene TUNEL-Markierung zeigten, den Typ-I-Zellen zugeordnet. Es wurden pro Region 3 Gesichtsfelder betrachtet und der Mittelwert apoptotischer (Typ II) Zellen bestimmt. Für diesen Mittelwert wurde in Anlehnung an den oben beschriebenen Hypoxie-Ischämie-Score ein TUNEL-Score-Wert ermittelt (siehe Tab. 4).

Tab. 5: TUNEL-Score

TUNEL-Score	Anzahl der TUNEL-positiven Zellen
0	keine
1	1 bis 10
2	11 bis 30
3	31 bis 50
4	mehr als 50

4. 8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Computerprogramm „SPSS“ durchgeführt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert +/- Standardabweichung, wenn nicht anders angegeben. Signifikanz wurde angesichts der kleinen Tierzahl bei $p < 0,05$ angenommen.

Die physiologischen Variablen wurden mittels zweiseitigem ANOVA auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Einfluss von HI bzw. TPM) und im Zeitverlauf innerhalb einer Gruppe untersucht. Post-hoc-Vergleiche zwischen den Gruppen erfolgten jeweils paarweise mit multiplen t-Tests. Der Vergleich zwischen Baseline-Messungen physiologischer und serologischer Parameter und Messungen im Verlauf des Experiments erfolgte mit einseitigem ANOVA. Post-hoc-Vergleiche wurden mit Dunnett's Test für multiple Vergleiche mit der Baseline durchgeführt.

Für die morphologischen und immunhistochemischen Daten erfolgte die Untersuchung auf statistisch signifikante Gruppenunterschiede mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließenden paarweisen Mann-Whitney-U-Tests. Der Vergleich von Neuroscore und neuropathologischen Daten, sowie von TUNEL-Score und HE-Score erfolgte durch Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman.

5. ERGEBNISSE

5. 1. Pathophysiologische Ergebnisse

Den Resultaten der neuropathologischen Untersuchungen soll eine Übersicht über die Ergebnisse des pathophysiologischen Teils der Studie vorangestellt werden.

Unter den Ausgangsbedingungen bewegten sich der mittlere arterielle Blutdruck, der Säure-Base-Haushalt, die Blutgase und die Stoffwechselwerte innerhalb der physiologischen Grenzen und korrelierten mit anderen Daten neugeborener, narkotisierter, beatmeter Ferkel. Alle der Hypoxie-Ischämie ausgesetzten Tiere (HI, HI-TPM10, HI-TPM20) zeigten ein ähnliches Ausmaß an metabolischer Azidose, d. h. reduziertem pH und erhöhtem arteriellem Laktat. Desweiteren traten in allen diesen drei Gruppen entsprechende Änderungen der elektrischen Hirnaktivität und eine Hyperglykämie in ähnlicher Weise auf. Die metabolischen Parameter erholten sich größtenteils innerhalb des ersten postoperativen Tages. Insgesamt zeigten sich keine relevanten Effekte einer Topiramat-Applikation auf den mittleren arteriellen Druck oder metabolische Parameter während der gesamten Beobachtungsperiode.

Überlebensrate

Alle Tiere der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppen überlebten während der 68-stündigen Beobachtungsperiode. Zwei Tiere der HI-Gruppe starben, eines 9,5 Stunden (Nr. 726) und das zweite 41,5 Stunden (Nr. 734) nach Experimentbeginn. In der Autopsie zeigte sich eine Hirnstammherniation als Folge eines Hirnödems. Die mittlere Überlebenszeit war 60,4 Stunden in der HI-Gruppe, im Gegensatz zu 72 Stunden in den anderen Gruppen (nichtsignifikanter Unterschied).

Anfallsaktivität

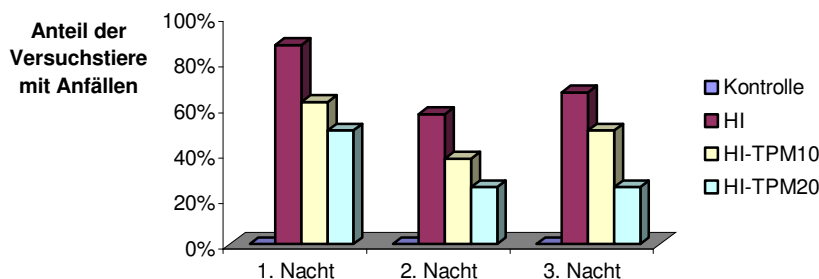


Abb. 3: Nächtliche Anfallsaktivität während der Nachbeobachtungsphase

In der Kontrollgruppe traten keine Anfälle auf. In der HI-Gruppe hatten in der ersten Nacht 7 von 8 Tieren Anfälle (88%), 4 von 7 (57%) in der zweiten Nacht und 4 von 6 (67%) in der dritten Nacht. In der HI-TPM10-Gruppe traten in der ersten Nacht bei 5 Tieren (63%), in der zweiten bei 3 (38%) und in der dritten bei 4 (50%) Anfälle auf. In der HI-TPM20-Gruppe hatten in der ersten Nacht 50% der Tiere und in den beiden folgenden Nächten jeweils 25% der Tiere Anfälle (siehe Abb. 3). Die Anfallsreduktion in den Behandlungsgruppen im Vergleich zur HI-Gruppe war nicht signifikant.

Neurologisches Outcome

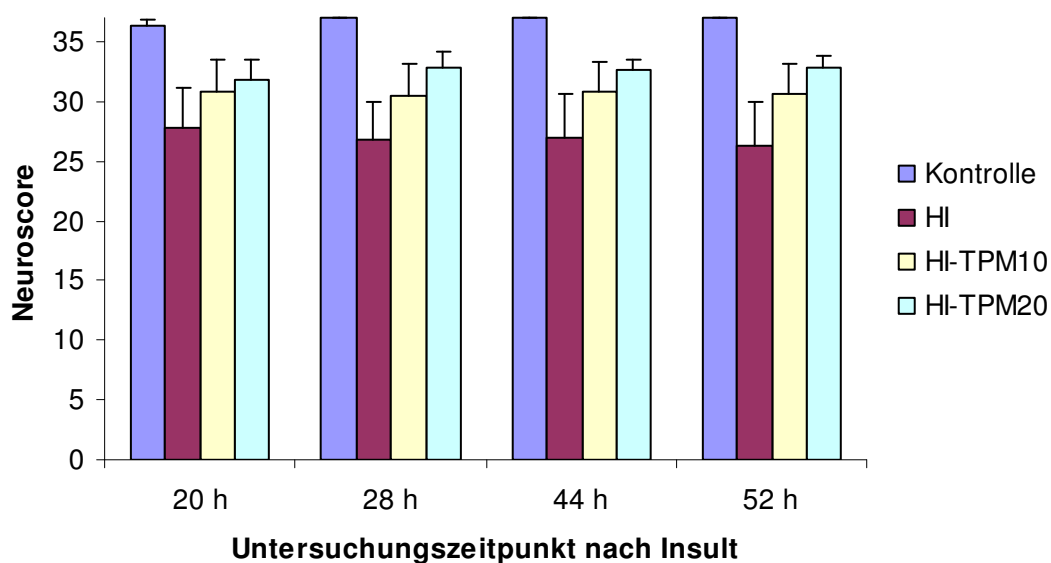


Abb. 4: Neurologisches Outcome während der Nachbeobachtungsphase

Die neurologischen Funktionen wurden 20, 28, 44 und 52 Stunden nach dem Insult getestet. Es gab in keiner Gruppe relevante Effekte auf die Vigilanz. Milde neurologische Defizite wurden in der Kontrollgruppe bei der ersten Untersuchung gesehen. Diese waren wahrscheinlich der Anästhesie geschuldet und nach 28 Stunden vollständig reversibel. Hypoxie-Ischämie erzeugte anhaltende neurologische Defizite ein bis drei Tage nach dem Insult. Eine statistische Analyse zeigte eine signifikante neurologische Behinderung aller einer Hypoxie-Ischämie unterworfenen Tiere. Eine Zeitabhängigkeit konnte nicht festgestellt werden (siehe Abb. 4).

5. 2. Neuropathologische Ergebnisse

5. 2. 1. HE-Färbung

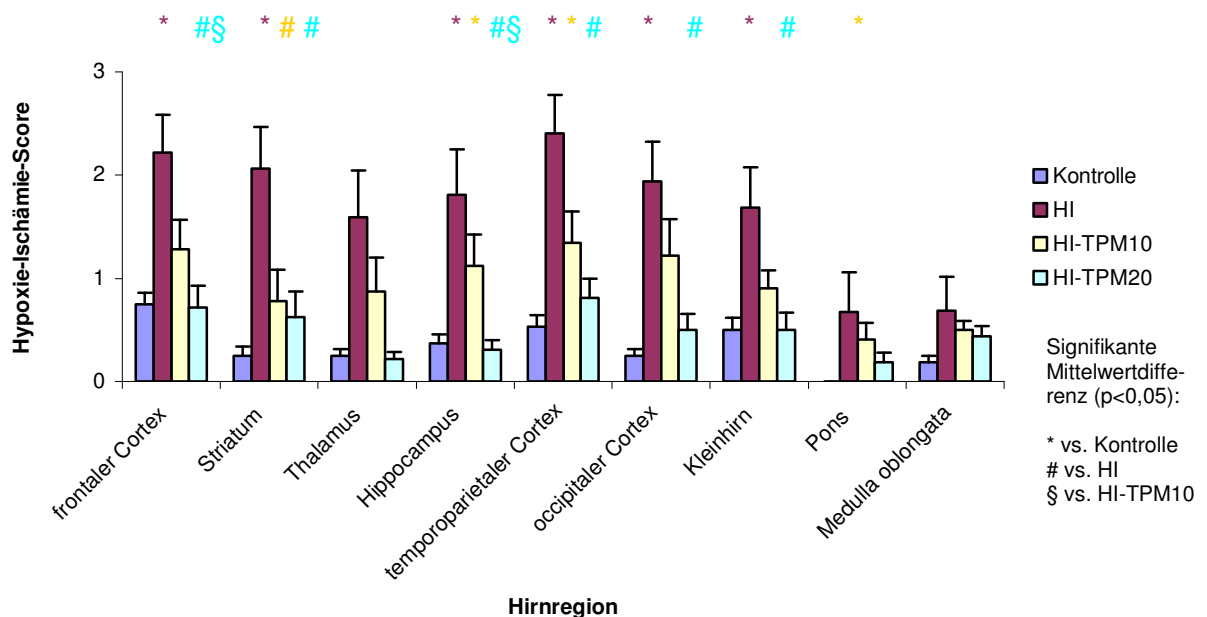


Abb. 5: Mittlerer Hypoxie-Ischämie-Score der Hirnregionen in der HE-Färbung

1. Kontrollgruppe: In den Hirnen der Kontrolltiere ließen sich vereinzelt hypoxisch-ischämisch geschädigte Nervenzellen nachweisen (Mittelwert (MW) über allen Regionen und Tieren **0,34**). Dies betraf insbesondere den frontalen und temporoparietalen Cortex und das Striatum. Lediglich die Schnitte eines Tieres (Nr. 769) waren völlig frei von geschädigten Nervenzellen (siehe Beispielabbildungen Nr. 7 und Nr. 8).

2. Hypoxie-Ischämie-Gruppe: Die Tiere dieser Gruppe zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe einen stärkeren Nervenzellschaden in allen Hirnregionen, gemittelt über alle Tiere (MW über alle Tiere und Regionen **1,68**).

Bezüglich der Schwere der Schädigung ließen sich drei Gruppen unterscheiden:

- Nr. 726 (MW über alle Regionen 4,0), Nr. 776 (MW über alle Regionen 2,8) und Nr. 734 (MW über alle Regionen 3,2) waren stark geschädigt. Sie zeigten ein generalisiertes Auftreten der typischen eosinophilen, triangulären Zellen in allen Cortex-Laminae (I bis IV) und ein generalisiertes Hirnödem (siehe Beispielabbildungen Nr. 11 und 12).
- Nr. 729 (MW 1,1) und Nr. 800 (MW 1,2) zeigten eine mittelschwere Schädigung, mit insbesondere fokalen Nervenzellschädigungen und fokalem

Ödem. Die hypoxischen Nervenzellen waren bei diesen Tieren vorzugsweise in den tieferen Cortex-Schichten (IV und V) in Form laminärer Nekrosen (siehe Beispielabbildungen Nr. 9 und Nr. 10).

- c) Nr. 751 (MW 0,5), Nr. 789 (MW 0,4) und Nr. 795 (MW 0,4) zeigten dagegen nur vereinzelt Auftreten von hypoxischen Nervenzellen ohne Ödem, ähnlich den Tieren der Kontrollgruppe. Wiederum traten die geschädigten Nervenzellen vorwiegend in Lamina IV und V auf.

Hippocampus, Striatum, Kortex und Kleinhirn waren die am meisten geschädigten Regionen nach Hypoxie-Ischämie. Hier konnte jeweils ein signifikant höheres Maß an Zellschädigung im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (frontaler Cortex $p = 0.003$; Striatum $p < 0.001$; Hippocampus $p = 0,012$; temporoparietaler Cortex $p < 0.001$; okzipitaler Cortex $p = 0.001$; Kleinhirn $p = 0.032$). Im Vergleich dazu zeigte der Hirnstamm nur sehr wenig Nervenzellschädigung (MW über alle Tiere = 0,7), ohne signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (siehe Abb. 5).

3. Behandlungsgruppen (HI-TPM10 und HI-TPM20): Beide Behandlungsgruppen zeigten im Vergleich zur HI-Gruppe eine geringere Anzahl geschädigter Nervenzellen, wobei der Schaden tendenziell von der HI-Gruppe über die HI-TPM10 (MW über alle Tiere und Regionen **0,9**) zur HI-TPM20 (MW **0,5**) hin abnahm.

In der **HI-TPM10-Gruppe** fanden sich:

- a) ein Tier (Nr. 787; MW über alle Regionen 3,1) mit schwerer generalisierter hypoxisch-ischämischer Nervenzellschädigung und generalisiertem Hirnödem (wie in der HI-Gruppe). Im Cortex waren alle Laminae (I bis IV) betroffen.
- b) zwei Tiere mit mittelgradiger Schädigung: Nr. 744 (MW 1,1) und Nr. 790 (MW 1,3) in Form fokaler Ansammlungen hypoxischer Nervenzellen im Hippocampus und im Cortex in den Laminae IV und V.
- c) die übrigen fünf Tiere mit leichter Schädigung (MW $< 1,0$), d.h. mit vereinzelt hypoxischen Nervenzellen

Die Tiere der **HI-TPM20-Gruppe** wiesen insgesamt ein geringes Ausmass an Schädigung auf. Ähnlich der Kontrollgruppe fanden sich meist nur vereinzelte hypoxische Nervenzellen im Cortex, Striatum und Hippocampus. Als Ausnahmen sind zu nennen:

- a) Tier Nr. 780 mit einem mittelgradigen Schaden beidseits im Striatum und Cortex
- b) Tier Nr. 788 mit einem mittelgradigen Schaden beidseits im Striatum

Ein signifikant niedrigerer Zellschaden konnte gezeigt werden für:

- a) HI-TPM10 gegenüber HI: im Striatum ($p = 0.006$)
- b) HI-TPM20 gegenüber HI: im frontalen Cortex ($p = 0.001$), temporoparietalen Cortex ($p = 0.002$), okzipitalen Cortex ($p = 0.006$), Striatum ($p = 0.003$), Hippocampus ($p = 0.004$) und Kleinhirn ($p = 0.010$).
- c) HI-TPM20 gegenüber der HI-TPM10: im Hippocampus ($p = 0.012$) und frontalen Cortex ($p = 0.039$)

Hirnregionen

Im **Cortex** zeigte sich eine von der Stärke des Schadens abhängige Verteilung der hypoxischen Nervenzellen. Bei stark geschädigten Tieren (MW über alle Regionen 3 bis 4) fanden sich generalisiert eosinophil-triangularäre Nervenzellen in allen Cortex-Laminae (I bis VI), wohingegen bei leicht- bis mittelgradiger Schädigung (MW über alle Regionen 1 bis 2) vorzugsweise fokal hypoxische Nervenzellen in den tieferen Laminae (IV und V) als laminäre oder vereinzelte Nekrosen auftraten. Es traten keine großflächigen Infarzierungen mit Untergang von Gefäßen oder weißer Substanz auf.

Im **Hippocampus** ließen sich beim Vergleich der Subregionen (Gyrus dentatus und CA1 bis CA4) in keiner der einer Hypoxie-Ischämie ausgesetzten Gruppen (HI, HI-TPM10, HI-TPM20) signifikante Mittelwertunterschiede nachweisen (siehe Abb. 6).

Im **Thalamus** und **Medulla oblongata** waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Untersuchungsgruppen nachweisbar. In keiner der Untersuchungsgruppen und in keiner Hirnregion traten signifikante rechts-linkshemisphärische Seitenunterschiede auf.

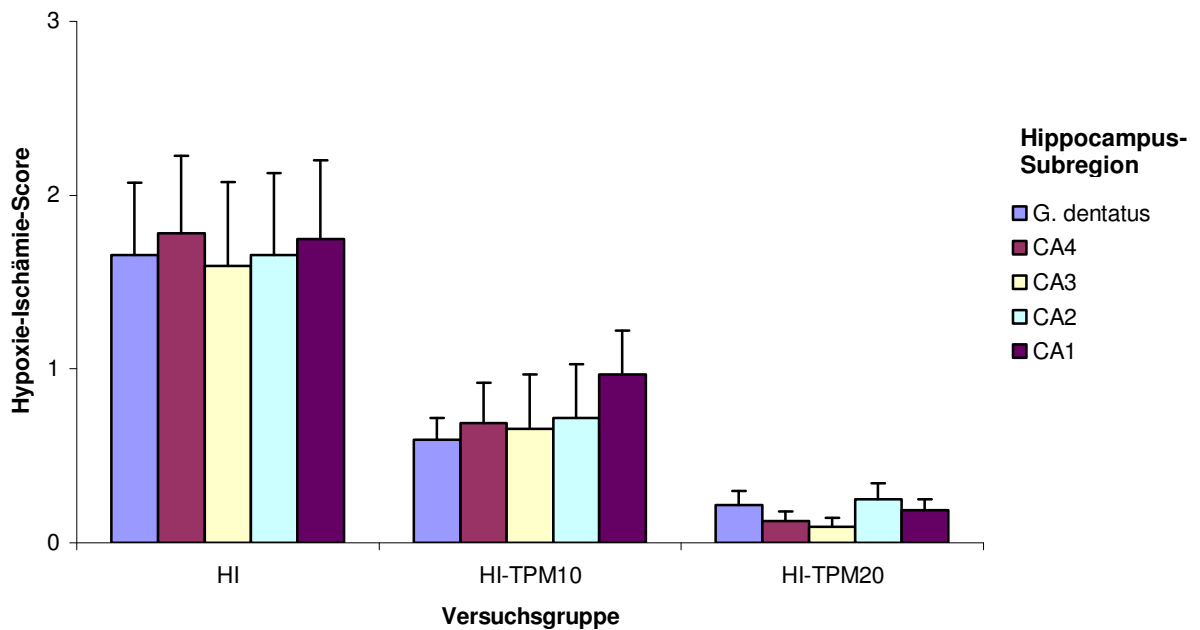


Abb. 6: Subregionenspezifischer Hypoxie-Ischämie-Score im Hippocampus

Zusammenfassung: In der Kontrollgruppe ließen sich nur minimale Zellschäden nachweisen. Die Tiere der Hypoxie-Ischämie-Gruppe zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant stärkere Zellschäden, vor allem im Cortex, Striatum und Hippocampus. Die mit Topiramat behandelten Tiere wiesen nach Hypoxie-Ischämie signifikant weniger nekrotischen Zellschaden im Vergleich zur nicht-behandelten HI-Gruppe auf. Signifikant war dieser Unterschied für die HI-TPM10-Gruppe im Striatum, und für die HI-TPM20-Gruppe im Hippocampus, Striatum, Cortex und Kleinhirn – also in den durch die Hypoxie-Ischämie am meisten geschädigten Regionen. Im frontalen Cortex und im Hippocampus zeigte sich eine Dosisabhängigkeit dieses Effekts, d. h. der Zellschaden war in der HI-TPM20-Gruppe signifikant geringer als in der HI-TPM10-Gruppe. Zwischen der HI-TPM20-Gruppe und der Kontrollgruppe gab es in keiner Hirnregion signifikante Unterschiede des mittleren Hypoxie-Ischämie-Scores, d.h. es konnte mit dieser Dosis ein histologisch fassbarer Zelltod verhindert werden. In der HI-TPM10-Gruppe lag ein im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant stärkerer Zellschaden im Hippocampus, temporoparietalen Cortex und Pons vor.

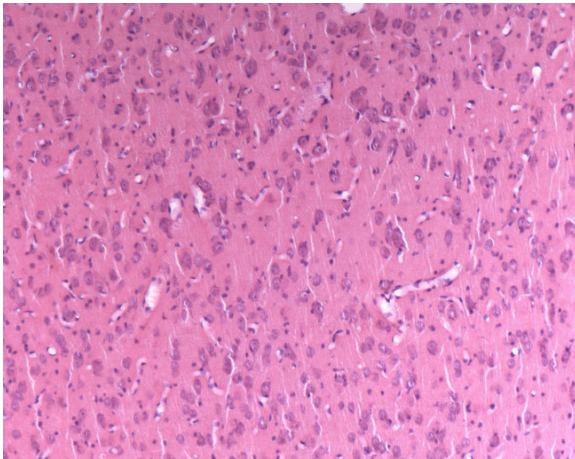


Abb. 7: HE, Kontrollgruppe, 100 ×

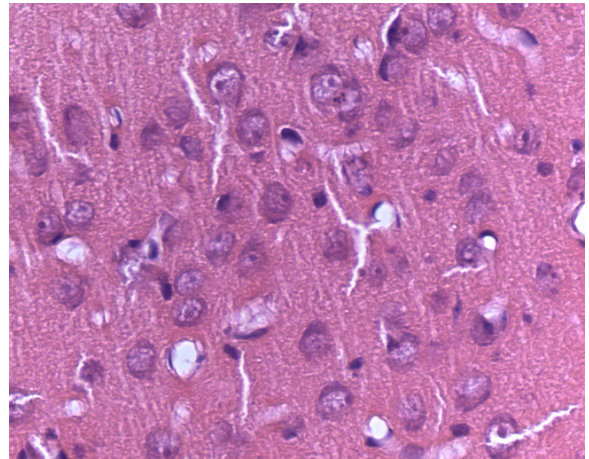


Abb. 8: HE, Kontrollgruppe, 400 ×

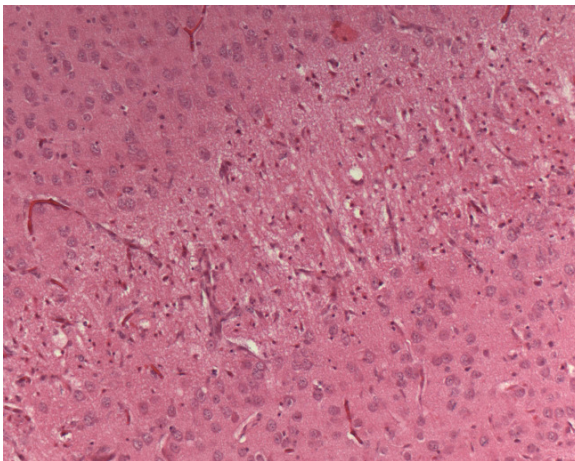


Abb. 9: HE, mittelgradiger Schaden, 100 ×

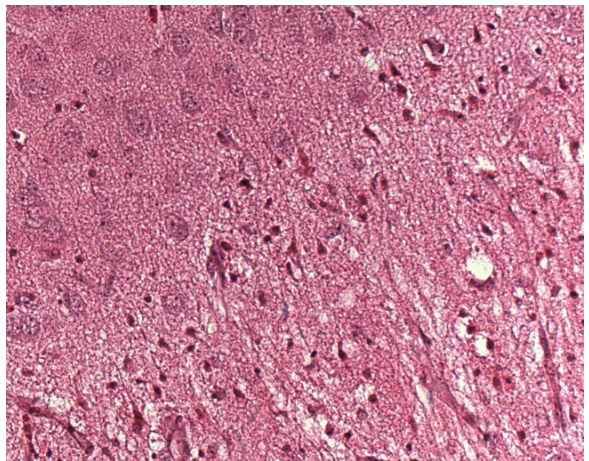


Abb. 10: HE, mittelgradiger Schaden, 400 ×

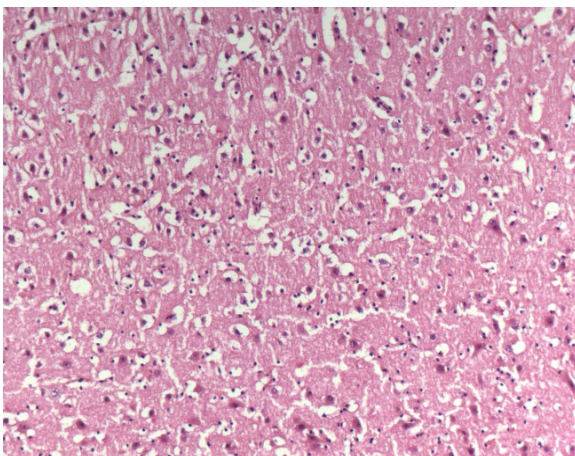


Abb. 11: HE, generalisierter Schaden, 100 ×

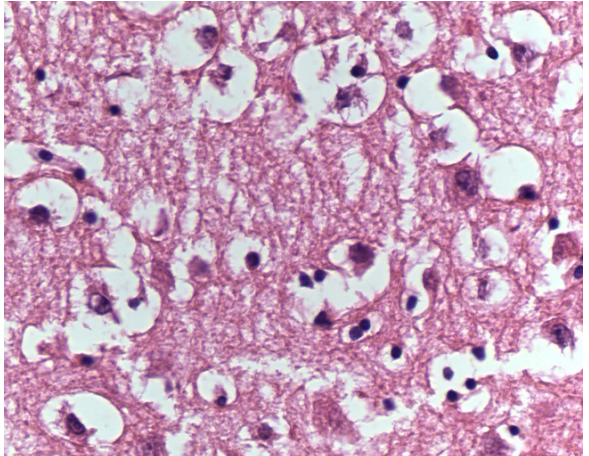


Abb. 12: HE, generalisierter Schaden, 400 ×

5. 2. 2. TUNEL-Färbung

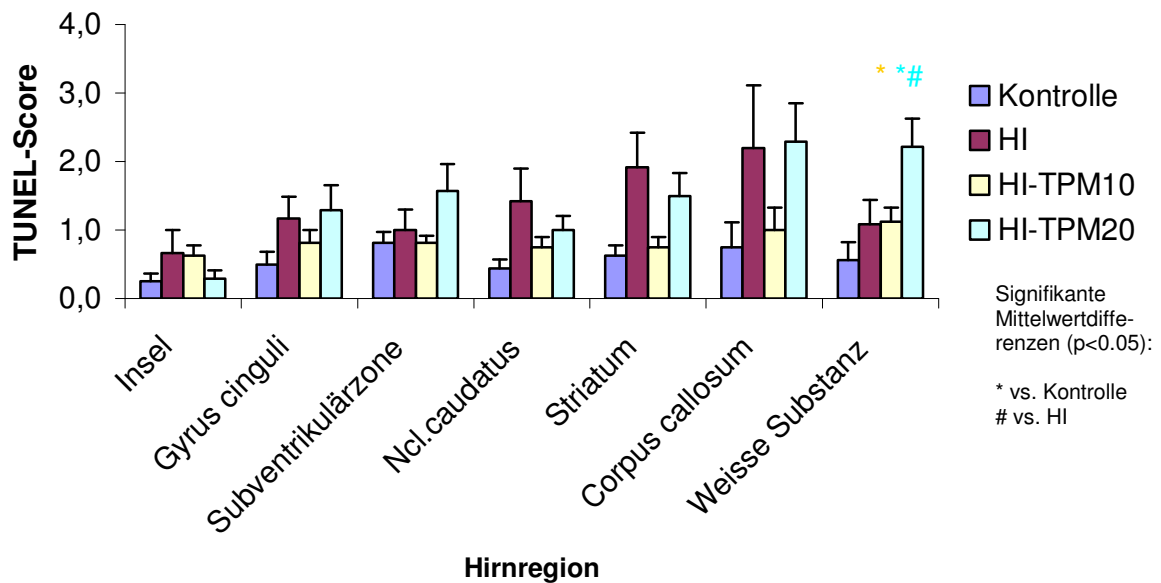


Abb. 13: Mittlerer TUNEL-Score der einzelnen Hirnregionen

Es zeigte sich insgesamt eine relativ große Streubreite der Zahl TUNEL-positiver Zellen. In allen Gruppen fanden sich Score-Werte von 0 bis 4, aber mit unterschiedlicher Häufigkeit (siehe Abb. 13).

1. Kontrollgruppe: Die Gehirne der Kontrolltiere wiesen TUNEL-positive Zellen in geringer Anzahl auf (MW für alle Regionen $< 1,0$). Hierbei dominierten die Subventrikulärzone und das Corpus callosum. Im insulären Kortex fanden sich kaum TUNEL-positive Zellen (MW = 0,3).

2. HI-Gruppe: Hier zeigten sich in allen untersuchten Hirnregionen tendenziell mehr TUNEL-positive Zellen als in der Kontrollgruppe. Die Score-Mittelwerte waren ≥ 1 für alle Regionen, mit Ausnahme des insulären Kortex (MW = 0,7). Die meisten TUNEL-positiven Zellen wiesen das Corpus callosum (MW = 2,2) und das Striatum (MW = 1,9) auf. Der Score-Mittelwert stieg in allen Regionen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf mehr als das Doppelte an, mit Ausnahme der Subventrikulärzone (1,3 fach) und der frontalen weißen Substanz (1,8 fach). Die Zunahme an TUNEL-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe war jedoch aufgrund der großen Streubreite für keine Region statistisch signifikant (siehe Beispielabbildungen 14 und 15).

3. HI-TPM10-Gruppe: Im Vergleich zu den eben genannten Gruppen zeigten die Tiere dieser Gruppe meist nur tendenzielle Veränderungen der Anzahl apoptotischer Zelluntergänge: Die Score-Mittelwerte in fast allen untersuchten Regionen tendenziell kleiner als in der HI-Gruppe und größer als in der Kontrollgruppe. Eine Ausnahme bildete In der Subventrikulärzone entsprach der TUNEL-Score-Mittelwert dem Kontrollgruppe und in der frontalen weißen Substanz dem der HI-Gruppe. Statistische Signifikanz konnte bezüglich des Mittelwertunterschied (Zunahme) im Vergleich zur Kontrollgruppe allerdings nur für die frontale weiße Substanz im Sinne einer Zunahme nachgewiesen werden ($p = 0,023$).

4. HI-TPM20-Gruppe: Auch in dieser Gruppe zeigten sich meist nur tendenzielle, nicht signifikante Effekte:

- a) Insulärer Kortex: Hier war der Score-Mittelwert gleich dem der Kontrollgruppe, d.h. tendenziell kleiner als in der HI-Gruppe und HI-TPM10-Gruppe.
- b) Nucleus caudatus und Striatum: Hier war der Score-Mittelwert zwar kleiner als in der HI-Gruppe, aber größer als in der Kontrollgruppe und der HI-TPM10-Gruppe.
- c) Gyrus cinguli, Subventrikulärzone, Corpus callosum und frontale weiße Substanz: In diesen Regionen waren die Score-Mittelwerte der HI-TPM20-Gruppe die höchsten aller vier Untersuchungsgruppen. Die höchsten Scores zeigten sich im Corpus callosum ($M = 2,3$) und in der frontalen weißen Substanz ($M = 2,2$; $p = 0,002$). Für letztere ließ sich ein signifikant höherer Score-Mittelwert sowohl gegenüber der Kontrollgruppe ($p = 0,001$) als auch gegenüber der HI-Gruppe ($p = 0,041$) nachweisen.

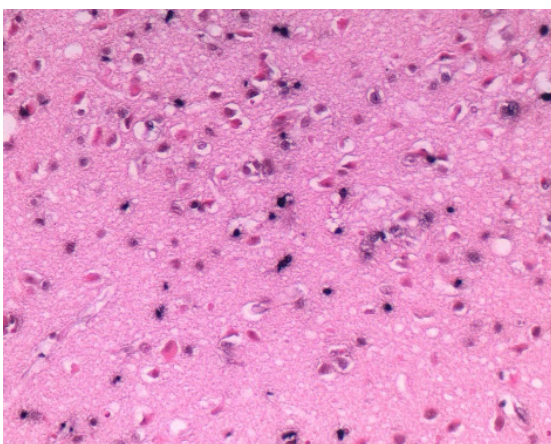


Abb. 14: TUNEL-positive Zellen, 200 ×

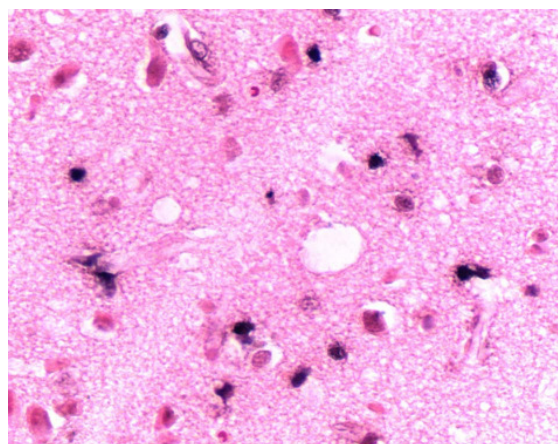


Abb. 15: TUNEL-positive Zellen, 400 ×

Zusammenfassung:

Die Anzahl TUNEL-positiver, DNA-fragmentierter Zellen

- war in der HI-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell größer
- lag in der HI-TPM10-Gruppe zwischen der Kontrollgruppe und der HI-Gruppe
- war in der HI-TPM20-Gruppe in den meisten Regionen größer als in der Kontrollgruppe und der HI-TPM10-Gruppe.

Statistische Signifikanzen zeigten sich nur in der frontalen weißen Substanz für die Zunahme des Scores:

- in HI-TPM10 gegenüber der Kontrolle
- in HI-TPM20 gegenüber der Kontrolle
- in HI-TPM20 gegenüber der HI-Gruppe.

Korrelation zwischen HE-Grading und TUNEL-Score

In der HI-Gruppe lag eine signifikant positive Korrelation zwischen der Zahl nekrotischer und apoptotischer Zellen vor. Der Spearman-Korrelationskoeffizient zwischen TUNEL-Score und HE-Grading betrug für den Mittelwert der untersuchten Hirnregionen 0,874, für das Striatum 0,950 und für den frontalen Cortex 0,808. In den Behandlungsgruppen konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Zahl nekrotischer und apoptotischer Zellen festgestellt werden.

Korrelation zwischen HE-Grading und Neuroscore

Beim Vergleich der erhobenen Neuroscorewerte und des histologischen Gradings (Tiermittelwerte) zeigte sich eine signifikant negative Korrelation für jeden der vier Erhebungszeitpunkte mit dem HE-Grading (siehe Tab. 6), d. h. Tiere mit einem schlechten neurologischen Outcome wiesen auch stärkere histopathologische Schäden auf.

Tab. 6: Korrelation zwischen Neuroscore und HE-Grading

Zeitpunkt der Neuroscore-Erhebung	Rangkorr.koeff. nach Spearman
20 h	-0,560
28 h	-0,655
44 h	-0,615
52 h	-0,612

5. 2. 3. MBP-Färbung

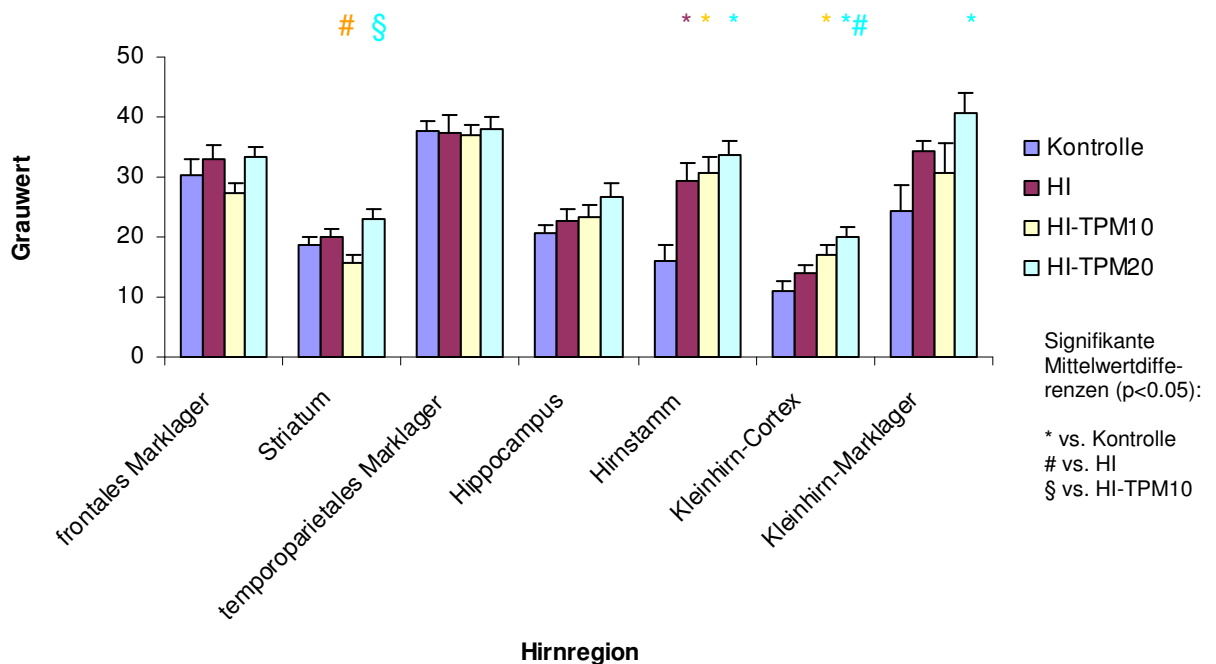


Abb. 16: Ergebnisse der MBP-Färbung

Die gemessenen Grauwerte, d.h. MBP-Konzentrationen, waren innerhalb der einzelnen Gruppen und Regionen recht homogen, d. h. sie wiesen eine geringe Streubreite auf.

1. Kontrollgruppe: Die höchsten Dichtewerte zeigten die frontale und temporoparietale weiße Substanz.

2. HI-Gruppe: Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikant höhere MBP-Konzentration im Hirnstamm ($p = 0,003$) und eine tendenzielle, nichtsignifikant höhere MBP-Konzentration in der zerebellären weißen Substanz. In den übrigen Hirnregionen lag der mittlere Dichtewert nur leicht über (frontale weiße Substanz, Striatum, Hippocampus, zerebellärer Cortex) bzw. unter (temporoparietale weiße Substanz) dem der Kontrollgruppe.

3. HI-TPM10-Gruppe: Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Dichtewertes für den Hirnstamm ($p < 0.001$) und für den zerebellären Kortex ($p = 0.011$). Die übrigen Hirnregionen zeigten gegenüber der Kontrollgruppe nichtsignifikant höhere (Hippocampus, zerebelläre weiße Substanz) bzw. niedrigere

(frontale und temporo-parietale weiße Substanz, Striatum, Thalamus) MBP-Konzentration.

Im *Vergleich zur HI-Gruppe* traten zeigten sich sowohl leicht niedrigere (frontale, temporoparietale und zerebelläre weiße Substanz, Striatum) als auch leicht höhere (Hippocampus, Thalamus, Hirnstamm, zerebellärer Cortex) mittlere Dichtewerte. Der Unterschied war im Striatum signifikant.

4. HI-TMP20-Gruppe: Bei diesen Tieren zeigte sich im *Vergleich zu den Kontrolltieren* eine signifikant höhere mittlere MBP-Konzentration im Hirnstamm ($p < 0,001$), der zerebellären weißen Substanz ($p = 0,006$) und dem zerebellären Cortex ($p = 0,001$). In den anderen Hirnregionen waren die Unterschiede nicht signifikant.

Im *Vergleich zur HI-Gruppe* war der Dichtewerte im zerebellären Kortex signifikant erhöht ($p = 0,011$), in den anderen Regionen bestanden keine signifikanten Differenzen. Ebenso war die mittlere MBP-Konzentration im *Vergleich zur HI-TPM10-Gruppe* nur im Striatum signifikant verändert (erhöht $p = 0,002$), in allen anderen Regionen aber nichtsignifikant verändert.

Zusammenfassung: Die frontale und temporoparietale weiße Substanz, sowie der Hippocampus wiesen variable, nichtsignifikante Befunde auf. Im Hirnstamm und Zerebellum dagegen zeigten die hypoxisch-ischämisch geschädigten Tiere (HI, HI-TPM10, HI-TPM20) höhere MBP-Konzentrationen als die Kontrolltiere, signifikant insbesondere für die HI-TPM20-Gruppe. Dabei bestanden zwischen diesen drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede mit Ausnahme des zerebellären Kortex (HI vs. HI-TPM20) und des Striatums (HI vs. HI-TPM10 und HI-TPM10 vs. HI-TPM20).

6. DISKUSSION

6. 1. Tiermodell

Wie in anderen Bereichen der Wissenschaft werden auch in den Biowissenschaften Modelle als vereinfachte Versionen komplexer Systeme verwendet, welche sonst für Untersuchungen zu vielschichtig und schwer fassbar sind. Auf diese Weise können einzelne Komponenten des Gesamtsystems untersucht werden, mit dem Ziel, daraus generelle Aussagen abzuleiten – wohl wissend um die Einschränkungen, die mit einer solchen Übertragung vom Modell auf die Wirklichkeit verbunden sind. Da die perinatale hypoxisch-ischämische Enzephalopathie, wie auch die intrakranielle Hämorrhagie, einer direkten Untersuchung unter natürlichen Umständen kaum zugänglich ist, wurden für die Erforschung dieser Entitäten verschiedene Tiermodelle entwickelt. Während des Experiments werden dabei die Tiere einer oder mehrerer Noxen ausgesetzt, von denen bekannt ist, dass sie in der Perinatalzeit beim Feten bzw. Neugeborenen oben genannte Störungen hervorrufen können.

In den letzten Jahrzehnten wurden dabei verschiedene Labortiere (Nager, Ferkel, Schafe, Primaten, Ziegen, Welpen, Kaninchen), Experimentieranordnungen, Methoden der Induktion des Insults (generalisierte Hypoxie mit/ohne Hypotension, Ischämie durch ein- oder beidseitige Karotisligatur mit/ohne Hypoxie u. a.), Dauer des Insults, Endpunkte für einen erfolgreichen Insult (z. B. ausreichende EEG-Suppression) und Nachbeobachtungszeiten gewählt (Roohey et al. 1997). Die Vor- und Nachteile der einzelnen Modelle wurden mehrfach diskutiert (Hagberg et al. 2002, Raju 1992), und die Überlegenheit eines bestimmten Ansatzes kann noch nicht abschließend beurteilt werden. Einleuchtend ist jedoch, dass kein Tiermodell in der Lage sein kann, die Komplexität des menschlichen Gehirns vollständig zu erfassen, sondern dass nur die kumulative Erfahrung langjähriger Forschung mit verschiedenen Tiermodellen pathophysiologische Erklärungen der oben genannten Erkrankungen liefert und somit die Grundlagen für rationale und ethisch vertretbare klinische Studien erbringt (Raju 1992).

Ein ideales Tiermodell zur Untersuchung der perinatalen Asphyxie wird von Raju wie folgt charakterisiert (Raju 1992):

- Artmerkmale: eine dem Menschen vergleichbare perinatale Hirnentwicklung; ausreichende Körpergröße für die Überwachung und Untersuchung anderer Organsysteme
- Anästhesie: keine Beeinflussung des zerebralen Blutflusses, des zerebralen Stoffwechsels oder anderer Organfunktionen
- Insult: direkte Verursachung des Hirnschadens (durch Gefäßverschluss; nicht indirekt durch Hypotension); konsistentes und reproduzierbares Ausmaß an Hirnschaden; minimale andere Organschäden, d. h. Überleben des Tieres bei signifikantem Hirnschaden
- Ökonomie: leichte Verfügbarkeit und Pflege der Versuchstiere bei verträglichen Kosten

Generell stellt sich bei den diversen Tiermodellen das Problem der Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Feten, denn neben anderen Parametern vollzieht sich auch die Hirnreifung speziesspezifisch mit einer charakteristischen, noch im Detail zu erforschenden Kinetik. Auch zu vergleichbaren Gestationszeitpunkten weisen verschiedene Tierarten ein abweichendes Maß an anatomischer Reife auf und ihre funktionellen Antworten auf identische Reize variieren (Raju 1992). Desweiteren kann man die Hirnentwicklung und -reifung unter verschiedenen Gesichtspunkten betrachten: morphologischen, neurophysiologischen und metabolischen. So dass die Hirnentwicklung und Vergleichbarkeit des Reifegrades je nach der Fragestellung und dem experimentellen Kontext beurteilt werden muss (Hagberg et al. 2002).

Viele Modelle der hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie nutzen gegenwärtig Rattenjunge im Zeitraum von 7 bis 14 Tage postnatal, welche bezüglich der Hirnreife als annähernd vergleichbar mit menschlichen Reifgeborenen betrachtet werden. Vorteilhaft bei diesen Ansätzen ist die gute, kostengünstige Verfügbarkeit von Ratten. Nachteilig ist die geringe Körpergröße des Tieres, die häufige biochemische Messungen und die Beurteilung systemischer Effekte (kardiovaskulär, renal, pulmonal) erschwert (Raju 1992). Außerdem muss beachtet werden, dass bei der generellen Schwierigkeit des Vergleichs des Reifegrades des Zentralnervensystems zwischen den Spezies hier die sehr vom Säuger abweichende Anatomie (z. B. lissenzephalie Oberfläche) des Rattenhirns hinzukommt, die die Übertragbarkeit der

Ergebnisse auf den Menschen einschränkt (Hagberg et al. 1997, Hagberg et al. 2002).

Im vorliegenden Versuchsansatz wurden neugeborene Ferkel als Versuchstiere gewählt. Das Ferkelmodell ist inzwischen gut etabliert und standardisiert. Vorteile von Ferkeln als Versuchstiere sind die zu menschlichen Neugeborenen ähnliche Größe, Gewicht, Stoffwechsel, Kreislauf, zerebrale Reifung und die gute, relativ kostengünstige Verfügbarkeit (Foster et al. 2001, Haaland et al. 1997). Von allen verwendeten Tierarten zeigt das Ferkel bei der Geburt einen Reifegrad des Gehirns, der dem des menschlichen Neugeborenen am ähnlichsten ist (Dobbing und Sands 1979, Hagberg et al. 2002). Dies begünstigt die Übertragbarkeit von Ergebnissen auf menschliche Neugeborene.

Auch nicht-menschliche Primaten ähneln bezüglich der Hirnentwicklung dem Menschen sehr stark. Allerdings schränken hier die Kosten und ethische Bedenken die Verwendbarkeit als Versuchstiere ein. Im Gegensatz dazu ist das Rattenhirn bei der Geburt weniger reif und das Schafgehirn bei der Geburt reifer als das menschliche (Foster et al. 2001).

Bei den Untersuchungsansätzen zur hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie unterscheidet man akute von chronischen Modellen (bei letzteren: Überleben > 24 Stunden nach Insult). Während akute Studien zum Verständnis der Pathophysiologie der Asphyxie beitragen, liefern chronische Modelle wichtige Erkenntnisse bezüglich des induzierten histopathologischen Hirnschadens (Raju 1992). Ein dem unsrigen ähnliches, chronisches Hypoxie-Ischämie-Modell an neugeborenen Ferkeln wurde von LeBlanc et al. entwickelt und hat sich als nützlich für Studien zur Neuroprotektion nach Hypoxie-Ischämie erwiesen (LeBlanc et al. 1990, LeBlanc et al. 1991): Ein bis drei Tage alte Ferkel werden anästhesiert und assistiert beatmet. Für einen Zeitraum von 30 Minuten erfolgt kombiniert der Verschluss beider Karotiden und eine hämorrhagische Hypotension (66% des Ausgangswertes). Während der letzten 15 Minuten der Ischämie werden die Ferkel zusätzlich einer Hypoxie von $FiO_2=0.6$ ausgesetzt. Die Tötung der Versuchstiere erfolgt 72 Stunden nach Experimentbeginn. Bei diesem Modell wird das Gehirn einer Hypoxie und einer partiellen Ischämie ausgesetzt, denn Ferkel haben einen dem Menschen ähnlichen Circulus Willisi, so dass bei Unterbindung beider Carotiden noch eine partielle Perfusion des Hirns über die Vertebralarterien erfolgen kann (LeBlanc et al. 1990). Ein ähnliches Modell wurde von Thoresen angewandt (Thoresen et al. 1995).

Als Kritikpunkte zum Ferkelmodell wurden angeführt: Obwohl das Gehirn eines neugeborenen Ferkels histologisch dem des menschlichen Reifgeborenen sehr ähnlich ist, besitzt es in physiologischer Hinsicht einen höheren Reifegrad. Neugeborene Ferkel können nach der Geburt schon laufen, vokalisieren und zeigen soziale Interaktionen. Sie haben höhere Raten an zerebralem Blutfluss und Metabolismus. Darüber hinaus ist die Reifung und Wachstumsrate schneller, so dass ein zwei Wochen altes Ferkel mit einem jungen Kind vergleichbar ist (Hagberg et al. 2002). Im Rahmen einer perinatalen Asphyxie können sowohl Hypoxie als auch Ischämie auftreten. Viele Tiermodelle (insb. mit Rattenjungen und Ferkeln) kombinieren deshalb Hypoxie mit operativem Verschluss zerebraler Gefäße (Roohey 1997), denn es wurde gezeigt, dass eine der beiden Noxen allein keinen signifikanten Hirnschaden erzeugen kann (Johnston et al. 1995, Johnston et al. 2001a, Rice et al. 1981). Hier wurde kritisiert, dass die Methode der regionalen Ischämie durch operative Karotisligatur dem realen, klinischen Setting der perinatalen Asphyxie unähnlich ist und weitere Gefahren und Nebenwirkungen in sich birgt. Dem entsprechend wurden zur Verbesserung der klinischen Relevanz Modelle entwickelt, die das Ferkel einer globalen Hypoxie aussetzen unter Vermeidung operativer Eingriffe. Auf diese Weise wird in Anlehnung an die klinische Situation der Asphyxie der gesamte Körper demselben hypoxischen Stress ausgesetzt (Foster et al. 2001, Thoresen et al. 1996). Ischämie wurde in diesen Modellen durch hypoxieinduzierte Hypotonie erreicht. Allerdings sind bei diesen Modellen infolge der stärkeren Hypoxie ($\text{FiO}_2 = 3$ bis 4%) kardiale Komplikationen häufiger (LeBlanc et al. 1990). Trotz dieser Einwände wird die Gefäßligatur weiterhin bei Neugeborenen-Ferkel-Studien zur perinatalen hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie angewandt (Chang et al. 1999, Lorek et al. 1994, Yue et al. 1997).

Unser Modell erwies sich als geeignet zur Induktion eines signifikanten Hirnschadens bei den Versuchstieren mit teilweise lebensbedrohlichen Komplikationen: Zwei von acht Tieren in der Hypoxie-Ischämie-Gruppe entwickelten ein massives Hirnödem und verstarben vor Ende der geplanten Nachbeobachtungszeit infolge einer Hirnstammeinklemmung. Bei den übrigen Tieren konnte durch den Versuchsansatz ein konsistentes Ausmaß an leicht- bis mittelgradiger neuronaler Schädigung erzeugt werden, welche sich für die Untersuchung möglicher neuroprotektiver Interventionen eignet (Raju 1992).

6. 2. Neuroscore

Die klinische Evaluation der Versuchstiere erfolgte anhand eines Neuroscores mit dem Wertebereich von 10 (tiefes Koma) bis 37 (normal) zweimal pro Tag. Beim Vergleich der erhobenen Neuroscorewerte mit dem histologischen Grading zeigte sich eine signifikant negative Korrelation, also Tiere mit niedrigen Neuroscorewerten wiesen ein entsprechend schlechtes histologisches Outcome auf (mit hohen HE-Grading-Werten). Dies spricht für die Validität der neurologischen und histopathologischen Beurteilung. Am deutlichsten war die negative Korrelation für den Zeitpunkt 28 Stunden nach Insult.

Eine stärkere Abweichung von dieser Korrelation trat nur bei einem Tier in Erscheinung (Nr. 776): Bei einem relativ guten Neuroscore-Wert zum Zeitpunkt 52 h nach Insult (Neuroscore = 30) erbrachte die Histologie einen relativ starken neuronalen Schaden (mittleres HE-Grading = 2,75). Erklären könnte diese Diskrepanz eine verzögerte neuronale Schädigung, die sich im Intervall zwischen der letzten neurologischen Untersuchung (52 h) und der Tötung (68 h) vollzogen hat.

6. 3. Neuropathologische Auswirkungen der Hypoxie-Ischämie: Nekrose und Apoptose

Kontrovers werden in der Literatur die zum neuronalen Tod führenden Mechanismen, sowie die Beiträge von Nekrose und Apoptose zum Zelluntergang nach hypoxisch-ischämischen Insult des Gehirns diskutiert. Während in der Vergangenheit ischämischer Nervenzelltod zunächst als nekrotisch betrachtet wurde (Garcia et al. 1993, Garcia und Kamijyo 1974), mehrten sich im letzten Jahrzehnt die Hinweise darauf, dass insbesondere am verzögerten Zelluntergang nach Hypoxie-Ischämie Apoptose maßgeblich beteiligt sein könnte. Neuronale Apoptose wurde in verschiedenen Tiermodellen nach fokaler und globaler Ischämie bei Nagern (Charriaut-Marlangue et al. 1996, Li et al. 1995, Link et al. 1993, MacManus et al. 1995) und Säugern (Mehmet et al. 1994, Yue et al. 1997) gefunden. Post mortem im kindlichen Hirngewebe nach hypoxisch-ischämischem Insult konnte Apoptose nachgewiesen (Edwards et al. 1997). Der Aktivierung des mitochondrialen Pfads der Apoptose wurde dabei eine wichtige Rolle für den Zelltod nach zerebraler Ischämie zugewiesen. Sie könnte ein wichtiges Bindeglied zwischen verzögertem Energieversagen und Apoptose im sich entwickelnden Gehirn sein (Johnston 2001, Puka-Sundvall et al. 2000).

Als Teil des vorliegenden Projektes wurde diese Fragestellung untersucht, indem zur Quantifizierung der nekrotischen Zelluntergänge die lichtmikroskopische Beurteilung konventionell HE-gefärbten Hirnschnitte nach bekannten Kriterien für Zellnekrose erfolgte. Zum Nachweis apoptotischer Zelluntergänge im Hirngewebe wurde die TUNEL-Technik zur Markierung fragmentierter DNA angewendet.

Schon bei den Tieren der Kontrollgruppe ließen minimale nekrotische Zellschäden nachweisen, welche der Anästhesie, dem operativen Prozedere, der Perfusionsfixation, einer Hirnkompression bei Herauspräparation aus dem Schädel oder der histologischen Verarbeitung geschuldet sein können (Brambrink et al. 1999, Yue et al. 1997). Auch zeigten sich TUNEL-positive Zellen in geringer Anzahl bei diesen Tieren in allen Regionen des frontalen Hirnschnitts, insbesondere in der Subventrikulärzone und im Corpus callosum. Dies ist verständlich, weil Apoptose im sich entwickelnden Gehirn physiologischerweise stattfindet, um die Zellzahl zu regulieren (Raff et al. 1993, Yue et al. 1997). Die Bevorzugung der erwähnten Regionen könnte auf den erhöhten Zellumsatz zurückzuführen sein, der dort infolge Oligodendrozytenproliferation und Myelinisierungsprozessen stattfindet.

Bei den Tieren der HI-Gruppe zeigten sich – im Vergleich zur Kontrollgruppe – in allen untersuchten Hirnregionen tendenziell mehr nekrotische und mehr apoptotische Zellen. Im Areal von Hippocampus, Cortex, Basalganglien und Kleinhirn war der Anteil nekrotischer Zellen an der Gesamtzahl ausgezählter Neurone mit 10 bis 30% signifikant erhöht. Die nekrotischen Nervenzellen traten bevorzugt in Form der selektiven neuronalen Nekrose mit teils parasagittaler Betonung des Schadens auf. Dies ist übereinstimmend mit den Befunden bei menschlichen reifen Neugeborenen nach perinataler Asphyxie, bei denen die erwähnten Hirnregionen (Cortex, Hippocampus, Basalganglien, Kleinhirn) bevorzugt geschädigt werden (Volpe 1995) und die genannten Läsionsmuster (selektive neuronale Nekrose, parasagittale Läsion in Grenzzonenregionen) am häufigsten vorkommen. Die bevorzugte Schädigung der genannten Regionen konnte auch in Neugeborenen-Ferkel-Modellen für globale Hypoxie nachgewiesen werden (Foster et al. 2001, Thoresen et al. 1996).

Insbesondere der Hippocampus ist sensibel gegenüber Hypoxie-Ischämie. Bei Ratten wurde eine besondere Vulnerabilität der CA1-Region sowohl bei fetalen als

auch bei adulten Individuen gezeigt (Volpe 1995). Sie entspricht dem Sommer'schen Sektor des menschlichen Hippocampus (Holm und West 1994). Im Gegensatz dazu war in dem vorliegenden Tiermodell im Hippocampus keine Subregionenspezifität der hypoxisch-ischämischen Zellschädigung nachweisbar. Ursache dieser Beobachtung können speziesspezifische Differenzen in der zerebralen Gefäßarchitektur sein. Literatur bzw. Untersuchungen zur unterschiedlichen Hypoxievulnerabilität der Hippocampus-Subregionen beim Ferkel lagen zum Zeitpunkt der Niederschrift dieser Arbeit nicht vor. Allerdings zeigte sich in Ferkelmodellen für Schädel-Hirn-Trauma eine ähnliche Abweichung des Schädigungsmusters von dem bei Rattenmodellen, insofern als dass beim Ferkel keine prominente Vulnerabilität einer bestimmten Hippocampus-Subregion gegenüber traumatischer Hirnschädigung nachzuweisen ist (Brodhun und Patt 1998, Clark et al. 1997).

Pons und Medulla wurden in unserem Modell durch den Insult nur leicht (nichtsignifikant) affektiert. Darin weicht das Schädigungsmuster unseres Ansatzes von den Merkmalen der HIE des Reifgeborenen ab, für die eine Beteiligung des Hirnstamms als charakteristisch gilt (Johnston et al. 2001a, Leech und Alvord 1977). Erklärt wird diese Erscheinung durch das spezifische Prozedere in unserem Modell: Bei systemischer Hypoxie erfolgte eine beidseitige Okklusion der Carotiden, so dass die vertebrobasiläre Perfusion erhalten blieb. Da bekannt ist, dass alleinige Hypoxie bei erhaltener Perfusion die Neurone des unreifen Hirns wenig wahrscheinlich schädigt, ist die relative Verschonung des Hirnstamms plausibel (Johnston et al. 2001a). Dies steht im Gegensatz zum klinischen Setting der perinatalen Asphyxie, die in der Regel eine kombinierte Einwirkung von Hypoxie und Ischämie auf das gesamte Hirn darstellt (Vannucci 1990).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten die Tiere der HI-Gruppe in allen untersuchten Hirnregionen tendenziell mehr apoptotische Zellen. Besonders ausgeprägt war die Zunahme TUNEL-positiver Zellen im Gyrus cinguli, Striatum, Nucleus caudatus und im Corpus callosum. Dabei ließ sich eine gewisse Korrelation zwischen den Ergebnissen der TUNEL-Färbung und der HE-Färbung feststellen, d. h. Tiere mit höheren HE-Gradings (mehr nekrotischen Zellen) wiesen auch tendenziell höhere TUNEL-Scores (mehr apoptotische Zellen) auf.

Zur Erklärung der Beteiligung apoptotischer und nekrotischer Zelluntergänge am Nervenzelltod nach Hypoxie-Ischämie wurden in der Vergangenheit verschiedene Konzepte aufgestellt:

1. Manche Autoren (Yue et al. 1997) sehen eine Abhängigkeit vom **Reifegrad der Zelle** für ihre „Entscheidung“ für Apoptose oder Nekrose, d. h. unreife Neurone gehen nach Insult vorzugsweise via Apoptose zugrunde, während terminal differenzierte Neurone eher nekrotisch werden (weil letztere die Apoptosekaskade schwerer aktivieren können). Dies wird gestützt durch die Beobachtung, dass die klassische Form der Apoptose im unreifen ZNS nach Schädigungen häufiger auftritt (Johnston 2001, Martin et al. 1998, McDonald et al. 1997). Im Vergleich zu reifen Modellen, zeigt sich bei unreifen Hypoxie-Ischämie-Tiermodellen ein größeres Ausmaß an Apoptose (Johnston et al. 2001a, Li et al. 1998, Nakajima et al. 2000).

So konnte in verschiedenen Ferkelmodell für transiente zerebrale Hypoxie-Ischämie (Brambrink et al. 1999, Martin et al. 1997a) nachgewiesen werden, dass nach Hypoxie-Ischämie insbesondere die Neurone der tieferen Laminae des zerebralen Cortex und die Purkinje-Zellen des Kleinhirns als ausdifferenzierte Zellen zur Nekrose neigen. Im Neocortex ist diese Präferenz durch den charakteristischen Ablauf der Migrationsphase der Hirnentwicklung begründet: Die zuerst im Neocortex eintreffenden Neurone siedeln sich in den tieferen Hirnschichten an und die jüngeren Neurone sich entsprechend in den oberen. Diese Betonung der tieferen Cortexschichten und der Purkinjezellen bei nekrotischen Zelluntergängen ließ sich auch bei unseren hypoxisch-ischämisch geschädigten Tieren beobachten. Im Gegenzug lässt dieses Konzept einen bevorzugt apoptotischen Untergang für die unreiferen Neurone der höheren Cortex-Laminae, für die Granularzellen des Kleinhirns und für die unreifen Oligodendrozyten der weißen Substanz erwarten, welche sich aufgrund der perinatal aktiven Myelinisierungsprozesse in Teilung und Differenzierung befinden. Unterstützen kann dieses Konzept unser Befund einer tendenziell erhöhten Apoptose im Corpus callosum. Eine signifikante Zunahme apoptotischer Zelluntergänge in der frontalen weißen Substanz nach hypoxisch-ischämischem Insult konnten wir in der HI-Gruppe allerdings nicht nachweisen.

2. Andere Autoren wiederum sehen eine Abhängigkeit der resultierenden Zelltodform von der **Stärke des Insults**: Ähnlich wie für den exzitotoxischen Zelltod (Johnston 2001, Nicotera und Lipton 1999) wird auch für die Ischämie angenommen, dass

sowohl Apoptose als auch Nekrose als teilweise überlappende Phänomene auftreten können. Während Nekrose relativ rasch und primär nach schwerer Schädigung auftritt, ist Apoptose ein verzögertes Phänomen, das vorzugsweise durch leichtere Schädigungen getriggert wird (Nelson und Silverstein 1991). Nach diesem Konzept würde man bei histopathologischer Begutachtung 3 Tage nach Insult eine negative Korrelation der Anzahl nekrotischer und apoptotischer Zellen erwarten. Das heißt, leicht geschädigte Tiere sollten mehr Apoptosen und weniger Nekrosen aufweisen, während schwer betroffene Tiere mehr Nekrosen und weniger Apoptosen zeigen müssten. Im Gegensatz dazu waren apoptotische und nekrotische Zelluntergänge in den Hirnen unserer HI-Gruppen-Tieren signifikant positiv korreliert. Das heißt, die Tiere mit vielen nekrotischen Zellen wiesen auch viele apoptotische auf und umgekehrt, so dass also die genannte Hypothese durch unsere Daten nicht belegt werden kann. Eine ähnliche Korrelation apoptotischer und nekrotischer Zelluntergänge wurde in einem anderen Modell für transiente globale Hypoxie-Ischämie beobachtet (Yue et al. 1997). Als Erklärung könnte man annehmen, dass die Antwort der einzelnen Zelle auf einen Insult eher von Zelltyp, ihrem Differenzierungsgrad und ihrer Lokalisation abhängt, als von der Stärke des Insults (Yue et al. 1997).

3. Manche Autoren bezweifeln generell eine prominente Rolle der Apoptose für neuronalen Zelltod nach Hypoxie-Ischämie, in Anbetracht der nach ihrer Ansicht **fehlenden soliden morphologischen Evidenz für Apoptose** beim ischämisch bedingten Untergang der selektiv hypoxievulnerablen Neurone (Martin et al. 1998). So wurde nachgewiesen, dass der Untergang der typischen, selektiv vulnerablen Neurone (Pyramidenzellen des Cortex und der CA1-Region, Basalganglien, Purkinjezellen) nach globaler Ischämie keine apoptotischen Merkmale aufweist (Deshpande et al. 1992, Kirino et al. 1984, Wyllie et al. 1980). Internukleosomale DNA-Fragmente, die in diesen Zellen nach Hypoxie-Ischämie transient nachweisbar sind, könnten eher Zeichen fortschreitender DNA-Degradation im Zuge der Nekrose sein, als ein Marker für Apoptose (Martin et al. 1998). Diese Autoren schlussfolgern, dass akuter und verzögerter, ischämischer neuronaler Zelltod strukturell und vielleicht auch mechanistisch identisch (nekrotisch) sind. Nach diesem Konzept beeinflusst die Stärke des Insultes eher den zeitlichen Ablauf des Zelltods, als dessen morphologische Ausprägung. Je stärker der Insult, umso rapider die

Progression nekrotischer Zelluntergänge („Maturation phenomenon“, Martin et al. 1998). Apoptose als Reaktionsform auf einen hypoxisch-ischämischen Insult wurde dagegen für andere neuronale Zellen (z.B. Granularzellen im zerebellären Cortex, Granularzellen im Gyrus dentatus und bestimmte Thalamusneurone) und für nicht-neuronale Zellen nachgewiesen: Oligodendrozyten der weißen Substanz, sowie perivaskuläre und parenchymale Zellen, z. B. infiltrierende Leukozyten. Ursache der Apoptosen könnten hier der Targetverlust oder die Axondegeneration im Rahmen der ischämischen Schädigung sein (Martin et al. 1998).

4. Alternativ wird – wie auch bei der Exzitotoxizität (Martin et al. 1998) – die strenge binäre Unterscheidung von Apoptose und Nekrose beim ischämisch bedingten Nervenzelltod in Frage gestellt werden. Es konnten Hybridformen aus Apoptose und Nekrose nachgewiesen werden (Johnston et al. 1995, Johnston et al. 2001a). Martin (Martin et al. 1998) stellt ein Zelltod-Konzept vor, welches annimmt, dass Neuronenuntergang im ZNS als morphologisches **Kontinuum zwischen Apoptose und Nekrose** existiert. Dieses ist definiert als Kontinuum mit der klassischen Apoptose und der klassischen Nekrose an den Endpunkten des Zelltodspektrums, sowie vielen möglichen intermediären Formen zwischen diesen Extremen. Natürlicher neuronaler Tod während der Entwicklung des ZNS ist phänotypisch apoptotisch. Exzitotoxischer neuronaler Tod kann als Apoptose, als Nekrose oder als Apoptose-Nekrose-Hybrid auftreten. Ischämieinduzierter Untergang selektiv vulnerabler Neurone ist phänotypisch nekrotisch, aber Apoptose kann in einigen anderen Neuronen und in nichtneuronalen Zellen auftreten. Target-Verlust, wie er im Rahmen von Neuronenuntergängen auftritt, kann selbst Ursache für neuronale Degeneration sein, die dann morphologisch der Apoptose sehr ähnlich ist. Es existieren Überlappungen, d. h. jede dieser Zelltodursachen hat mechanistische Komponenten, die sich von denen der anderen unterscheiden können, andere Mechanismen wiederum werden bis zu einem gewissen Grad gemeinsam genutzt (siehe Abb. 17 in Anlehnung an Martin et al. 1998). Apoptose und Nekrose müssen also keine sich gegenseitig ausschließenden Zelltodformen im geschädigten ZNS sein. Die konkrete Manifestation innerhalb der Breite des Apoptose-Nekrose-Kontinuums wird von diversen Faktoren beeinflusst: Schädigungsmechanismus, aktivierter Glutamat-Rezeptor-Typ und Reife des ZNS.

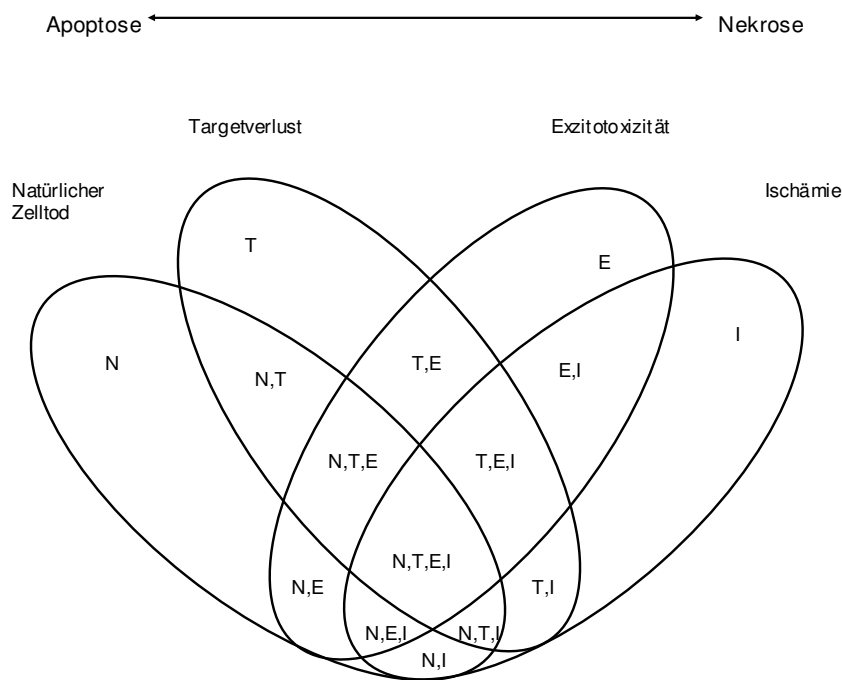


Abb. 17: Apoptose-Nekrose-Kontinuum des neuronalen Zelltods

Im Übrigen muss man die prinzipielle methodische Schwierigkeit der Detektion apoptotischer Zelluntergänge beachten: Einerseits weist die TUNEL-Methode Schwächen auf, dadurch dass sie bei der Markierung von DNA-Fragmentenden nicht sicher zwischen nekrotisch und apoptotisch entstandenen Fragmenten unterscheiden kann (Martin et al. 1998, Kuschinsky und Gillardon 2000). Durch Zuhilfenahme morphologischer Merkmale – wie in dieser Arbeit erfolgt – wird angestrebt, die Spezifität der Methode zu erhöhen. Desweiteren wurde gezeigt, dass Diskrepanzen zwischen morphologischen Merkmalen und DNA-Fragmentationsmustern der Zelltodformen bestehen können. So erfolgte der Nachweis internukleosomaler DNA-Fragmentation bei morphologisch nekrotischem Zelluntergang (Fukuda et al. 1993), bzw. von Apoptose ohne begleitende internukleosomale DNA-Fragmentation (Collins et al. 1992, Oberhammer et al. 1993, Tomei et al. 1993). Selbst der sichere Nachweis internukleosomaler DNA-Fragmente ist also nicht hundertprozentig spezifisch für Apoptose.

Aufgrund dieser Unsicherheiten hat sich das wissenschaftliche Interesse von der Analyse der konkreten Morphologie des hypoxisch-ischämischen Zelltods auf die letztendlich zum Zelluntergang führenden, deletären Kaskaden und deren therapeutische Beeinflussung verlagert (Kuschinsky und Gillardon 2000).

6. 4. Auswirkungen der Behandlung mit Topiramat

In den hypoxie vulnerablen Regionen des Hirns (Cortex, Striatum, Hippocampus, Kleinhirn) zeigte sich eine signifikante Reduktion des mittleren nekrotischen Zellschadens unter Topiramatbehandlung. Diese Beobachtung, sowie die Dosisabhängigkeit des Effekts zeigen eine neuroprotektive Wirkung des Medikaments. Darauf deuten auch die im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenzielle Besserung des Neuroscores, die Reduktion der Anfallshäufigkeit und die geringere Letalität der Behandlungsgruppen hin.

Solche neuroprotektiven Wirkungen von Topiramat bei Applikation nach einem hypoxisch-ischämischen Insult zeigten sich in verschiedenen Nagernmodellen in den vergangenen Jahren: In einem Wüstenrennmaus-Modell für globale Hypoxie konnte Topiramat den hippocampalen Schaden vermindern (Lee et al. 2000). In Ratten-Modellen für fokale Ischämie (Yang et al. 1998) und globale Hypoxie (Koh et al. 2004) reduzierte die Applikation von Topiramat den neuronalen Zellschaden. In Ratten-Schlaganfall-Modellen für Therapiekombinationen verstärkte Topiramat die neuroprotektiven Effekte von Thrombolyse (Yang et al. 2000) und Hypothermie (Liu et al. 2004).

Auf welche Weise Topiramat den beobachteten neuroprotektiven Effekt hervorruft, ist noch nicht abschließend geklärt. Durch einen hypoxisch-ischämischen Insult werden im neuronalen Gewebe eine Vielzahl von Kaskaden angestoßen, die letztendlich zu Zellschädigung und –tod führen. Insbesondere im perinatalen, unreifen Gehirn hat unter diesen Mechanismen die Exzitotoxizität eine herausragende Bedeutung (Johnston 2001). Aufgrund der verzögerten Entwicklung dieser Prozesse ergibt sich die Möglichkeit für neuroprotektive therapeutische Interventionen auch nach Insult („therapeutisches Fenster“). Aus dem Spektrum an Wirkmechanismen, die für Topiramat nachgewiesen wurden (Shank et al. 2000), erscheint ein Eingreifen der Substanz auf verschiedenen Ebenen der durch Hypoxie-Ischämie angestoßenen Kaskaden möglich:

- Seine positiv modulatorische Wirkung auf GABA_A-Rezeptoren verstärkt den Chlorid-Einstrom in die Zellen, verschiebt somit das Zellmembranpotential in Richtung Hyperpolarisation und erhöht die Krampfschelle (White et al. 1997). Da Anfälle bei vorgeschädigtem Gehirn den neuronalen Schaden verstärken können (Wirrell et al. 2001), ist durch eine antikonvulsive Wirkung auch eine neuroprotektive Wirkung vorstellbar.

- Durch seine negativ modulatorische Wirkung auf spannungsaktivierte Natrium- und Kalziumkanäle verringert es den im Rahmen einer Hypoxie-Ischämie infolge Membrandepolarisation auftretenden deletären Natrium- und Kalzium-Einstrom in die Zelle und hemmt die präsynaptische Glutamatfreisetzung (Alves et al. 2003, Taverna et al. 1999).
- Durch seine negativ modulatorische Wirkung auf Glutamatrezeptoren vom AMPA/Kainat-Typ könnte Topiramat einen Teil der exzitotoxischen Wirkungen von Glutamat, insbesondere den deletären Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration inhibieren (Angehagen et al. 2003, Poulsen et al. 2004).

In der Vergangenheit wurde oft die Bedeutung der Exzitotoxizität via Glutamatrezeptoren für den Zelltod nach Hypoxie-Ischämie betont (Johnston 2001). So zeigen sich am neonatalen Rattenmodell nach Hypoxie-Ischämie neuroprotektive Effekte durch Blockade der Glutamatrezeptoren, insbesondere vom NMDA-Typ und schwächer vom AMPA-Typ (Hagberg et al. 1994). In Neugeborenen-Ferkelmodellen für HI konnten dagegen weder klinisch noch histologisch neuroprotektive Effekte nach selektiver NMDA-Rezeptor-Blockade (LeBlanc et al. 1991) oder nach selektiven AMPA/Kainat-Rezeptor-Blockade (Brambrink et al. 1999, LeBlanc et al. 1995) nachgewiesen werden. Hier scheinen speziesspezifische Differenzen vorzuliegen. In Anbetracht der erwähnten Studien und des von uns beobachteten Effekts von Topiramat, scheint die Glutamatrezeptor-Blockade nicht der Hauptmechanismus der neuroprotektiven Wirkung des Medikaments zu sein. Andere Wirkfacetten, wie z. B. die Verstärkung der GABAergen Transmission oder die Blockade spannungsabhängiger Natrium- und Kalziumkanäle könnten im Vordergrund stehen.

Die Beeinflussung der apoptotischen Zelluntergänge durch Topiramat war in den meisten Hirnregionen nicht signifikant. So wiesen die Tiere der HI-TPM10-Gruppe in fast allen untersuchten Regionen nur tendenziell weniger TUNEL-positive Zellen auf als die HI-Gruppe. Auch in der HI-TPM20-Gruppe zeigten der insuläre Kortex, Nucleus caudatus und Striatum nur tendenziell weniger apoptotische Zelluntergänge als bei den Tieren der HI-Gruppe. Im Gegensatz dazu traten in der HI-TPM20-Gruppe in den Regionen Gyrus cinguli, Subventrikulärzone, Corpus callosum und frontale weiße Substanz mehr TUNEL-positive Zellen als in allen anderen Untersuchungsgruppen auf. Eine signifikante Korrelation der Zahl apoptotischer und

nekrotischer Zellen konnte in den Behandlungsgruppen nicht mehr festgestellt werden.

Nach diesen Ergebnissen urteilend, scheint Topiramat also vorzugsweise schützend auf nekrotisch untergehende Zellen zu wirken. Zu diesen Neuronen gehören nach (Martin et al. 1998) die ausdifferenzierten, selektiv hypoxie vulnerablen Neurone. Im Gegensatz dazu scheint eine protektive Beeinflussung der apoptotisch untergehenden, unreifen Neurone weniger wahrscheinlich. In der frontalen weißen Substanz kam es gegenüber der Kontrollgruppe sogar zu einem signifikanten Anstieg der Zahl apoptotischer Zellen sowohl in der HI-TPM10 als auch in der HI-TPM20-Gruppe. Ursächlich für diesen Effekt ist eine Beeinflussung des programmierten Zelltods der proliferierenden und differenzierenden Oligodendrozyten während der aktiven Myelinisierungsprozesse im perinatalen ZNS durch die komplexen Wirkmechanismen von Topiramat vorstellbar. In Übereinstimmung mit diesem Befund ist von anderen Antiepileptika bekannt, dass sie im perinatalen, unreifen Gehirn proapoptotische Effekte durch Blockade von Glutamat-Rezeptoren, durch starke Aktivierung der GABAergen Transmission und durch Modulation spannungsabhängiger Natriumkanäle entfalten können (Bittigau et al. 2002, Ikonomidou et al. 2001) – durch Mechanismen also, die an die Wirkmechanismen von Topiramat erinnern. In Studien an Rattenjungen trat eine erhöhte Apoptoserate nach Applikation NMDA-Rezeptor-blockierende Medikamente auf (Ikonomidou et al. 1999, Pohl et al. 1999).

6. 5. Beurteilung der weißen Substanz

Während perinatale Hypoxie-Ischämie bei Reifgeborenen vorzugsweise die Neurone der grauen Substanz schädigt, affektiert sie bei Frühgeborenen die weiße Substanz des Gehirns und ruft typischerweise die periventrikuläre Leukomalazie hervor (Volpe 1995). Der Zeitraum der größten Empfindlichkeit für PVL ist beim menschlichen Hirn zwischen der 24. und 32. Schwangerschaftswoche, wenn die periventrikuläre weiße Substanz vorwiegend durch proliferierende und differenzierende Oligodendrozytenvorläufer besiedelt wird (Back et al. 2001, Follett et al. 2000, Kinney und Back 1998). Die erhöhte Vulnerabilität der Oligodendrozytenvorläufer korreliert mit einer transient erhöhten Expression des Glutamat-Rezeptors vom AMPA/Kainat-Typ auf der Oberfläche unreifer Oligodendrozyten (Deng et al. 2003, Follett et al. 2004, Itoh et al. 2002). In vivo, am neonatalen Rattenmodell, wurde eine protektive Wirkung gegen hypoxisch-ischämisch bedingte Schädigungen der weißen Substanz, sowie eine Minderung der folgenden neuromotorischen Defizite durch den AMPA-Rezeptor-Antagonisten NBQX (Follett et al. 2000) und durch Topiramat (Follett et al. 2004) gezeigt. In vitro, am Hirngewebe menschlicher Neugeborener, konnte eine Abschwächung des vom AMPA/Kainat-Rezeptor-vermittelten Kalziuminflux und Zelltod durch NBQX und durch Topiramat nachgewiesen werden (Follett et al. 2004). Insgesamt ist also davon auszugehen, dass der Hauptmechanismus der hypoxisch-ischämischen Oligodendrozytenschädigung im unreifen Hirn über den Glutamat-rezeptor vom AMPA/Kainat-Typ vermittelt wird (Follett et al. 2004).

Um eine mögliche Schädigung der weißen Substanz bei unserem Tiermodell und vermutete protektive Effekte von Topiramat zu beurteilen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit myelinbasisches Proteins (MBP) immunhistochemisch dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen in der Kontrollgruppe erwartungsgemäß eine stärkere Anfärbung der frontalen und der temporoparietalen weißen Substanz als des Striatums und des Hippocampus, denn in die weiße Substanz weist bekanntlich mehr Markscheiden und somit auch höhere MBP-Konzentrationen auf als die graue.

In den der Hypoxie-Ischämie ausgesetzten Tieren (HI-Gruppe und TPM-Gruppen) zeigte sich jedoch weder in der frontalen, noch in der temporoparietalen weißen Substanz, dem Striatum oder dem Hippocampus der oben beschriebene Verlust an MBP-Anfärbbarkeit. Dieses Ergebnis lässt zwei mögliche Interpretationen zu:

Erstens kann es sein, dass das von uns benutzte Modell ungeeignet zur Erzeugung einer signifikanten Schädigung der weißen Substanz ist. Wir verwendeten zwei bis fünf Tage alte Ferkel, die ihrem Hirnreifegrad nach dem menschlichen Reifgeborenen entsprechen. Zu diesem Zeitpunkt ist das Hirn bereits von reifen, myelinisierenden Oligodendrozyten besiedelt, welche die Phase erhöhter Vulnerabilität bereits hinter sich gelassen haben. In (Follett et al. 2000) wurde gezeigt, dass die AMPA-vermittelte Glutamat-Toxizität altersabhängig ist: maximal in P7, wenn das Rattenhirn mit unreifen Oligodendrozyten besiedelt ist, geringer in P11. Die in der Literatur beschriebenen Tiermodelle zur Erzeugung einer PVL verwendeten Tiere, die in ihrer Hirnreife dem menschlichen Frühgeborenen entsprechen: P4-Rattenjunge (Lin et al. 2004), P7-Rattenjunge (Liu et al. 2002), fetale Lämmer in utero (Petersson et al. 2002).

Zweitens muss beachtet werden, dass die Degradation von Strukturproteinen Zeit benötigt. Insbesondere das Myelin und seine Proteine scheinen relativ abbauresistenter als andere Strukturproteine (z. B. Tau1, APP) zu sein (Irving et al. 2001). In einem Rattenmodell für fokale Ischämie wurde gezeigt, dass die MBP-Anfärbbarkeit der geschädigten Regionen nach 24 h noch unverändert ist und nach 1 Woche nur teilweise reduziert ist. Erst 2 Wochen nach Insult zeigte sich ausgeprägter MBP-Verlust im Gebiet der entsprechenden Region (Irving et al. 2001). Es ist also gut möglich, dass in unserem Modell 3 Tage nach Insult schon eine Schädigung der weißen Substanz und ein Funktionsverlust des MBP vorliegen, obwohl noch keine signifikante Veränderung der Anfärbbarkeit eingetreten ist. Andere Modelle wiederum konnten eine deutliche MBP-Degradation schon zu früheren Zeitpunkten nachweisen, z. B. ein fetales Lamm-Modell (Petersson et al. 2002) 3 Tage und zwei Rattenmodelle (Lin et al. 2004, Liu et al. 2002) 5 Tage nach Insult.

Schließlich darf man auch speziesspezifische Besonderheiten nicht außer Acht lassen. Der Zeitgang der Hirnentwicklung differiert von Art zu Art und Analogien sind mit Vorsicht zu ziehen. So können sich die Neigung zu Schädigungen der weißen Substanz und die Geschwindigkeit des MBP-Abbaus nach Insult altersabhängig in den verschiedenen Tiermodellen unterscheiden. Ein dem unsrigen vergleichbares Ferkelmodell, das die Anfärbbarkeit von MBP nach einem hypoxisch-ischämischen Insult zeitabhängig untersucht, lag zum Zeitpunkt der Niederschrift dieser Arbeit nicht vor.

Im Gegensatz zum Vorderhirn ließ sich im Einzugsgebiet der vertebrobasilären Zirkulation (Kleinhirn und Hirnstamm) ein tendenzieller Anstieg der MBP-Konzentrationen bei den hypoxisch-ischämisch geschädigten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe ausmachen. Signifikant war dieser Befund insbesondere im Hirnstamm in allen drei Versuchsgruppen. Interpretieren lässt sich dieses Ergebnis möglicherweise im Sinne einer Induktion von MBP. So wurden in einem Rattenmodell nach transientser MCA-Okklusion erhöhte MBP-mRNA-Konzentrationen in der Perinfarkt-Region nach 3 Tagen nachgewiesen. Es wurde weiterhin gezeigt, dass diese Gentranskription zu MBP-Synthese und Myelinbildung führt (Gregersen et al. 2001). Wenn man die Analogie zwischen der partiell perfundierten Penumbra bei MCA-Okklusion mit der partiell perfundierten hinteren Zirkulation bei beidseitiger Carotisokklusion zulässt, erscheint eine Interpretation verstärkter MBP-Expression im Sinne einer regenerativen Antwort möglich.

Eine signifikante Beeinflussung der MBP-Konzentration durch eine Behandlung mit Topiramaten lässt sich in unserem Ferkelmodell nicht ableiten, was entweder entwicklungsbedingt ist oder dem zu frühen Zeitpunkt der immunhistochemischen Untersuchung geschuldet sein kann. Hier erscheinen weitere Untersuchungen an chronischen Modellen sinnvoll.

7. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Das vorliegende Tiermodell erwies sich geeignet zur Induktion eines signifikanten Hirnschadens, indem bei zwei Tieren eine letale Läsion und bei den übrigen ein konsistentes Ausmaß an leicht- bis mittelgradiger neuronaler Schädigung erzeugt werden konnte, welches sich für die Untersuchung neuroprotektiver Interventionen eignet (Raju 1992). Das erzeugte Schädigungsmuster entsprach im wesentlichen den für asphyktische Neugeborene (Volpe 1995) und Ferkelmodelle (Foster et al. 2001, Thoresen et al. 1996) beschriebenen häufigsten Läsionen: selektive neuronale Nekrose und parasagittale kortikale Schädigung mit Signifikanz für die hypoxievulnerablen Areale von Hippocampus, Cortex, Basalganglien und Kleinhirn.

Durch Behandlung mit Topiramat nach erfolgtem Insult war eine Reduktion des morphologisch fassbaren, nekrotischen Zellschadens möglich, in der 10mg-Gruppe tendenziell und in der 20mg-Gruppe signifikant. Diese Beobachtungen zeigen eine neuroprotektive Wirkung des Medikaments. Darauf deuten auch die im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenzielle Besserung des Neuroscores, die Reduktion der Anfallshäufigkeit und die geringere Letalität der Behandlungsgruppen hin.

Eine signifikante Beeinflussung der apoptotischen Zelluntergänge war insbesondere für die 20mg-Gruppe in der frontalen weißen Substanz im Sinne eines Anstiegs nachweisbar, was auf proapoptotische Effekte von Topiramat in dieser Dosierung hinweist. Die optimale Dosis zur Reduktion nekrotischer Zelluntergänge unter Vermeidung apoptotischer liegt möglicherweise zwischen den gewählten Dosierungen. Zur Beurteilung sind Untersuchungen an größeren Populationen erforderlich.

Die Beteiligung von Nekrose und Apoptose am Neuronenverlust nach hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung ist noch Gegenstand der aktuellen Diskussion. Die prinzipiellen methodischen Schwierigkeiten der Detektion apoptotischer Zelluntergänge mit der TUNEL-Methode haben zur Verlagerung des wissenschaftlichen Interesses von der Analyse der konkreten Morphologie des hypoxisch-ischämischen Zelltods auf die letztendlich zum Zelluntergang führenden, deletären Kaskaden und deren therapeutische Beeinflussung geführt (Kuschinsky und Gillardon 2000).

Die immunhistochemische Färbung von MBP zeigte in keiner Hirnregion den erwarteten Verlust der Immunreaktivität nach hypoxisch-ischämischem Insult. Eine aussagekräftige Beurteilung des Einflusses von Topiramat auf die MBP-Immunreaktivität (und somit die weiße Substanz) ist aus besagten Gründen nicht ableitbar. Hier sind Untersuchungen an jüngeren Versuchstieren (ggf. intrauterin) bzw. mit längerer Nachbeobachtungsphase erforderlich.

8. LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

- Abe K, Aoki M, Kawagoe J, Yoshida T, Hattori A, Kogure K, Itoyama Y. 1995. Ischemic delayed neuronal death. A mitochondrial hypothesis. *Stroke*, 26(8):1478-1489.
- Alves OL, Doyle AJ, Clausen T, Gilman C, Bullock R. 2003. Evaluation of topiramate neuroprotective effect in severe TBI using microdialysis. *Ann N Y Acad Sci*, 993:25-34; discussion 48-53.
- Ames A, Wright RL, Kowada M, Thurston JM, Majno G. 1968. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol*, 52(2):437-453.
- Angehagen M, Ben-Menachem E, Ronnback L, Hansson E. 2003. Topiramate protects against glutamate- and kainate-induced neurotoxicity in primary neuronal-astroglial cultures. *Epilepsy Res*, 54(1):63-71.
- Armstead WM. 2000. Age-dependent cerebral hemodynamic effects of traumatic brain injury in newborn and juvenile pigs. *Microcirculation*, 7(4):225-235.
- Armstrong D, Norman MG. 1974. Periventricular leucomalacia in neonates. Complications and sequelae. *Arch Dis Child* 49(5):367-375.
- Azzopardi D, Robertson NJ, Cowan FM, Rutherford MA, Rampling M, Edwards AD. 2000. Pilot study of treatment with whole body hypothermia for neonatal encephalopathy. *Pediatrics* 106(4):684-694.
- Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Levine JM, Volpe JJ, Kinney HC. 2001. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *J Neurosci*, 21(4):1302-1312.
- Banasiak KJ, Xia Y, Haddad GG. 2000. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol*, 62(3):215-249.

- Barks JD, Silverstein FS, Sims K, Greenamyre JT, Johnston MV. 1988. Glutamate recognition sites in human fetal brain. *Neurosci Lett*, 84(2):131-136.
- Barks JD, Silverstein FS. 1992. Excitatory amino acids contribute to the pathogenesis of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Pathol*, 2(3):235-243.
- Bass WT, Malati N, Castle MC, White LE. 1998. Evidence for the safety of ascorbic acid administration to the premature infant. *Am J Perinatol*, 15(2):133-140.
- Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. 1991. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med* 91(3C):2S-13S.
- Battin MR, Dezoete JA, Gunn TR, Gluckman PD, Gunn AJ. 2001. Neurodevelopmental outcome of infants treated with head cooling and mild hypothermia after perinatal asphyxia. *Pediatrics* 107(3):480-484.
- Beilharz EJ, Williams CE, Dragunow M, Sirimanne ES, Gluckman PD. 1995. Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss. *Brain Res Mol Brain Res*, 29(1):1-14.
- Bhat RV, DiRocco R, Marcy VR, Flood DG, Zhu Y, Dobrzanski P, Siman R, Scott R, Contreras PC, Miller M. 1996. Increased expression of IL-1 β converting enzyme in hippocampus after ischemia: selective localization in microglia. *J Neurosci*, 16(13):4146-4154.
- Biagioni E, Mercuri E, Rutherford M, Cowan F, Azzopardi D, Frisone MF, Cioni G, Dubowitz L. 2001. Combined use of electroencephalogram and magnetic resonance imaging in full-term neonates with acute encephalopathy. *Pediatrics*, 107(3):461-468.

- Bittigau P, Sifringer M, Genz K, Reith E, Pospischil D, Govindarajalu S, Dzierko M, Pesditschek S, Mai I, Dikranian K, Olney JW, Ikonomidou C. 2002. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(23):15089-15094.
- Brambrink AM, Martin LJ, Hanley DF, Becker KJ, Koehler RC, Traystman RJ. 1999. Effects of the AMPA receptor antagonist NBXQ on outcome of newborn pigs after asphyxic cardiac arrest. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19(8):927-938.
- Brodhun M, Patt S (1998) Effects of hypothermia on fluid-percussion induced neurotrauma in juvenile pigs. *Clin Neuropath* 17:261
- Brodhun M, Fritz H, Walter B, Antonow-Schlorke I, Reinhart K, Zwiener U, Bauer R, Patt S. 2001. Immunomorphological sequelae of severe brain injury induced by fluid-percussion in juvenile pigs – effects of mild hypothermia. *Acta Neuropathol (Berl)*, 101(5):424-434.
- Brown AW, Brierley JB. 1972. Anoxic-ischaemic cell change in rat brain: light microscopic and fine-structural observations. *J Neurol Sci*, 16(1):59-84.
- Brown AW, Brierley JB. 1973. The earliest alterations in rat neurones and astrocytes after anoxia-ischaemia. *Acta Neuropathol (Berl)*, 23(1):9-22.
- Budd SL, Tenneti L, Lishnak T, Lipton SA. 2000. Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(11):6161-6166.
- Bursch W, Pfaffe S, Putz B, Barthel G, Schulte-Hermann R. 1990. Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis*, 11(5):847-853.
- Cataltepe O, Vannucci RC, Hietjan DF, Towfighi J. 1995. Effect of status epilepticus on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Pediatr Res*, 38(2):251–257.

- Chang YS, Park WS, Lee M, Kim KS, Shin SM, Choi JH. 1999. Near infrared spectroscopic monitoring of secondary cerebral energy failure after transient global hypoxia-ischemia in the newborn piglet. *Neurol Res*, 21(2):216-224.
- Charriaut-Marlangue C, Margail I, Represa A, Popovici T, Plotkine M, Ben-Ari Y. 1996. Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 16(2):186-194.
- Cheng Y, Deshmukh M, D'Costa A, Demaro JA, Gidday JM, Shah A, Sun Y, Jacquin MF, Johnson EM, Holtzman DM. 1998. Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Clin Invest*, 101(9):1992-1999.
- Choi DW, Rothman SN. 1990. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci*, 13:171-182.
- Choi DW. 1992. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol*, 23(9):1261-1276.
- Choi DW, Hartley DM. 1993. Calcium and glutamate-induced cortical neuronal death. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*, 71:23-34.
- Clancy RR, Sladky JT, Rorke LB. 1989. Hypoxic-ischemic spinal cord injury following perinatal asphyxia. *Ann Neurol*, 25(2):185-189.
- Clark RS, Kochanek PM, Dixon CE, Chen M, Marion DW, Heinemann S, DeKosky ST, Graham SH. 1997. Early neuropathologic effects of mild or moderate hypoxemia after controlled cortical impact injury in rats. *J Neurotrauma*, 14(4):179-189.
- Clarke PG. 1990. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)*, 181(3):195-213.

- Collins RJ, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JF. 1992. Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. *Int J Radiat Biol*, 61(4):451-453.
- Colton CA, Gilbert DL. 1993. Microglia, an in vivo source of reactive oxygen species in the brain. *Adv Neurol*, 59:321-326.
- Coyle JT, Puttfarcken P. 1993. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*, 262(5134):689-695.
- Dawes GS. 1968. *Foetal and Neonatal Physiology. A comparative study of the changes at birth.* Chicago: Year Book Medical Publishers.
- De Courten-Myers GM, Fogelson HM, Kleinholz M, Myers RE. 1989. Hypoxic brain and heart injury thresholds in piglets. *Biomed Biochem Acta* 48(2-3):S143-S148.
- De Reuck JL. 1984. Cerebral angioarchitecture and perinatal brain lesions in premature and full-term infants. *Acta Neurol Scand*, 70(6):391-395.
- De Roth L, Downie HG. 1976. Evaluation of viability of neonatal swine. *Can Vet J*, 17(11):275-279.
- D'Souza SW, McConnell SE, Slater P, Barson AJ. 1992. N-methyl-D-aspartate binding sites in neonatal and adult brain. *Lancet* 339(8803):1240.
- Deng W, Rosenberg PA, Volpe JJ, Jensen FE. 2003. Calcium-permeable AMPA/kainate receptors mediate toxicity and preconditioning by oxygen-glucose deprivation in oligodendrocyte precursors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(11):6801-6806.
- Deshpande J, Bergstedt K, Linden T, Kalimo H, Wieloch T. 1992. Ultrastructural changes in the hippocampal CA1 region following transient cerebral ischemia: evidence against programmed cell death. *Exp Brain Res*, 88(1):91-105.

- Dobbing J, Sands J. 1979. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev*, 3(1):79-83.
- Dombrowski GJ Jr., Swiatek KR, Chaoi KL. 1989. Lactate, 3-hydroxybutyrate, and glucose as substrates for the early postnatal rat brain. *Neurochem Res*, 14(7):667-675.
- Du Plessis AJ, Volpe JJ. 2002. Perinatal brain injury in the preterm and term newborn. *Curr Opin Neurol*, 15(2):151-157.
- Edwards AD, Yue X, Cox P, Hope PL, Azzopardi DV, Squier MV, Mehmet H. 1997. Apoptosis in the brains of infants suffering intrauterine cerebral injury. *Pediatr Res*, 42(5):684-689.
- Fachinformation zu Topiramat (Topamax®) von Janssen Cilag
- Fazekas JF, Alexander FAD, Hirnwich HE. 1941. Tolerance of the newborn to anoxia. *Am J Physiol* 134(2):281-287.
- Fern R, Moller T. 2000. Rapid ischemic cell death in immature oligodendrocytes: a fatal glutamate release feedback loop. *J Neurosci*, 20(1):34-42.
- Flamm ES, Demopoulos HB, Seligman ML, Poser RG, Ransohoff J. 1978. Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke*, 9(5):445-447.
- Fölsch UR, Kochsiek K, Schmidt RF. 2000. *Pathophysiologie*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- Follett PL, Rosenberg PA, Volpe JJ, Jensen FE. 2000. NBQX attenuates excitotoxic injury in developing white matter. *J Neurosci* 20(24): 9235-9241.
- Follett PL, Deng W, Dai W, Talos DM, Massilon LJ, Rosenberg PA, Volpe JJ, Jensen FE. 2004. Glutamate receptor-mediated oligodendrocyte toxicity in

periventricular leukomalacia: a protective role for topiramate." J Neurosci, 24(18):4412-4420.

Ford LM, Sanberg PR, Norman AB, Fogelson MH. 1989. MK-801 prevents hippocampal neurodegeneration in neonatal hypoxic-ischemic rats. Arch Neurol 46(10):1090-1096.

Foster KA, Colditz PB, Lingwood BE, Burke C, Dunster KR, Roberts MS. 2001. An improved survival model of hypoxia/ischaemia in the piglet suitable for neuroprotection studies. Brain Research, 919:122-131.

Franke CL, Palm R, Dalby M, Schoonderwaldt HC, Hantson L, Eriksson B, Lang-Jenssen L, Smakman J. 1996. Flunarizine in stroke treatment (FIST): a double blind, placebo-controlled trial in Scandinavia and the Netherlands. Acta Neurol Scand 93(1):56-60.

Friede RL. 1989. Developmental Neuropathology. New York: Springer-Verlag.

Fukuda K, Kojiro M, Chiu JF. 1993. Demonstration of extensive chromatin cleavage in transplanted Morris hepatoma 7777 tissue: apoptosis or necrosis? Am J Pathol, 142(3):935-946.

Garcia JH, Kamijyo Y. 1974. Cerebral infarction. Evolution of histopathological changes after occlusion of a middle cerebral artery in primates. J Neuropathol Exp Neurol, 33(3):408-421.

Garcia JH, Lossinsky AS, Kauffman FC, Conger KA. 1978. Neuronal ischemic injury: light microscopy, ultrastructure and biochemistry. Acta Neuropathol (Berl), 43(1-2):85-95.

Garcia JH, Yoshida Y, Chen H, Li Y, Zhang ZG, Lian J, Chen S, Chopp M. 1993. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. Am J Pathol, 142(2):623-635.

- Garcia-Alix A, Cabanas F, Pellicer A, Hernanz A, Stiris TA, Quero J. 1994. Neuron-specific enolase and myelin basic protein: relationship of cerebrospinal fluid concentrations to the neurologic condition of asphyxiated full-term infants. *Pediatrics*, 93(2):234-240.
- Gasic GP, Hollmann M. 1992. Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu Rev Physiol*, 54:507-536.
- Gerschenson LE, Rotello RJ. 1992. Apoptosis: A different type of cell death. *FASEB J* 6(7):2450-2455.
- Gilland E, Puka-Sundvall M, Hillered L, Hagberg H. 1998. Mitochondrial function and energy metabolism after hypoxia-ischemia in the immature rat brain: involvement of NMDA-receptors. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18(3):297-304.
- Ginsberg M. 1997. Injury mechanisms in the ischemic penumbra - approaches to neuroprotection in acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*, 7 (Suppl 2):7-12
- Glauser TA, Rorke LB, Weinberg PM, Clancy RR. 1990. Acquired neuropathologic lesions associated with the hypoplastic left heart syndrome. *Pediatrics*, 85(6):991-1000.
- Gregersen R, Christensen T, Lehmann E, Diemer NH, Finsen B. 2001. Focal cerebral ischemia induces increased myelin basic protein and growth-associated protein-43 gene transcription in peri-infarct areas in the rat brain. *Exp Brain Res*, 138(3):384-392.
- Guan J, Guan AJ, Sirimanne ES, Tuffin J, Gunning MI, Clark R, Gluckmann PD. 2000. The window of opportunity for neuronal rescue with insulin-like growth factor-1 after hypoxia-ischemia in rats is critically modulated by cerebral temperature during recovery. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20(3):513-519.

- Gustafson K, Hagberg H, Bengtsson BA, Brantsing C, Isgaard J. 1999. Possible protective role of growth hormone in hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatr Res*, 45(3):318-323.
- Haaland K, Loberg EM, Steen PA, Thoresen M. 1997. Posthypoxic hypothermia in newborn piglets. *Pediatr Res*, 41(4):505-512.
- Hagberg H, Thornberg E, Blennow M, Kjellmer I, Lagercrantz H, Thiringer K, Hamberger A, Sandberg M. 1993. Excitatory amino acids in the cerebral spinal fluid of asphyxiated infants: relationship to hypoxic-ischemic encephalopathy. *Acta Paediatr*, 82(11):925-929.
- Hagberg H, Gilland E, Diemer NH, Andine P. 1994. Hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain: histopathology after post-treatment with NMDA and non-NMDA receptor antagonists. *Biol Neonate*, 66(4):205-213.
- Hagberg G, Bona E, Gilland E, Puka-Sundvall M. 1997. Hypoxia-ischemia model in the 7-day-old rat: possibilities and shortcomings. *Acta Paediatr Suppl*, 422:85-88.
- Hagberg H, Ichord R, Palmer C, Yager JY, Vannucci SJ. 2002. Animal models of developmental brain injury: relevance to human disease. *Dev Neurosci*, 24:364-366.
- Hall RT, Hall FK, Daily DK. 1998. High-dose phenobarbital therapy in term newborn infants with severe perinatal asphyxia: a randomized, prospective study with three-year follow-up. *J Pediatr*, 132(2):345-348.
- Hanrahan JD, Sargentoni J, Azzopardi D, Manji K, Cowan FM, Rutherford MA, Cox IJ, Bell JD, Bryant DJ, Edwards AD. 1996. Cerebral metabolism within 18 hours of birth asphyxia: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *Pediatr Res*, 39(4 Pt 1):584-590.

- Hartmann A, Kuschinsky W, Hrsg. 1989. Cerebral ischemia and calcium. Berlin, Heidelberg: Springer, Verlag.
- Hattori H, Morin AM, Schwartz PH, Fujikawa DG, Wasterlain CG. 1989. Posthypoxic treatment with MK-801 reduces hypoxic-ischemic damage in the neonatal rat. *Neurology*, 39(5):713-718.
- Hattori H, Wasterlain CG. 1990. Excitatory amino acids in the developing brain: ontogeny, plasticity, and excitotoxicity. *Pediatr Neurol*, 6(4):219-228.
- Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805):770-776.
- Hicks RR, Smith DH, McIntosh TK. 1995. Temporal response and effects of excitatory amino acid antagonism on microtubule-associated protein 2 immunoreactivity following experimental brain injury in rats. *Brain Res*, 678(1-2): 151-160.
- Holm IE, West MJ. 1994. Hippocampus of the domestic pig: a stereological study of subdivisional volumes and neuron numbers. *Hippocampus*, 4(1):115-125.
- Holmes GL, Ben-Ari Y. 2001. The neurobiology and consequences of epilepsy in the developing brain. *Pediatr Res*, 49(3):320-325.
- Holtzman DM, Sheldon RA, Jaffe W, Cheng Y, Ferriero DM. 1996. Nerve growth factor protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Ann Neurol*, 39(1):114-122.
- Horn M, Schlote W. 1992. Delayed neuronal death and delayed neuronal recovery in the human brain following global ischemia. *Acta Neuropathol*, 85(1):79-87.
- Hossmann KA. 1987. Experimentelle Grundlagen der Ischämietoleranz des Gehirns. *Z Kardiol*, 76 (Suppl 4):47-66.

- Hsu SM, Raine L. 1981. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, 29 (11) :1349-1353.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. 1981. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol*, 75(6):816-821.
- Hudome S, Palmer C, Roberts RL, Mauger D, Housman C, Towfighi J. 1997. The role of neutrophils in the production of hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *Pediatr Res* 41(5):607-616.
- Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovskaja V, Turski L, Olnier JW. 1999. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283(5398):70-74.
- Ikonomidou C, Bittigau P, Siffringer M, Felderhoff-Mueser U. 2001. Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem Pharmacol*, 62(4):401-405.
- Irving EA, Bentley DL, Parsons AA. 2001. Assessment of white matter injury following prolonged focal cerebral ischemia in the rat. *Acta Neuropathol (Berl)*, 102(6):627-635.
- Ito U, Spatz M, Walker JT Jr, Klatzo I. 1975. Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta Neuropathol (Berl)*, 32(3):209-223.
- Itoh T, Beesley J, Itoh A, Cohen AS, Kavanaugh B, Coulter DA, Grinspan JB, Peasure D. 2002. AMPA glutamate receptor-mediated calcium signaling is transiently enhanced during development of oligodendrocytes. *J Neurochem* 81(2):390-402.
- Jabaudon D, Scanziani M, Gahwiler BH, Gerber U. 2000. Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(10):5610-5615.

- Johnston MV, Trescher WH, Taylor GA. 1995. Hypoxic and ischemic central nervous system disorders in infants and children. *Adv Pediatr*, 42:1-45.
- Johnston BM, Mallard EC, Williams CE, Gluckman PD. 1996. Insulin-like growth factor-1 is a potent neuronal rescue agent after hypoxic-ischemic injury in fetal lambs. *J Clin Invest* 97(2):300-308.
- Johnston MV. 1998. Selective vulnerability in the neonatal brain. *Ann Neurol*, 44(2):155-156.
- Johnston MV, Hoon AH. 2000. Possible mechanisms in infants for selective basal ganglia damage from asphyxia, kernicterus or mitochondrial encephalopathies. *J Child Neurol*, 15(9):588-591.
- Johnston MV. 2001. Excitotoxicity in neonatal hypoxia. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 7:229-234.
- Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W. 2001a. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res*, 49(6):735-741.
- Johnston MV, Nishimura A, Harum K, Pekar J, Blue ME. 2001b. Sculpting the developing brain. *Adv Pediatr*, 48:1-38.
- Kerr JF. 1971. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol*, 105(1):13-20.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4):239-257.
- Kinney HC, Back SA. 1998. Human oligodendroglial development: relationship to periventricular leukomalacia. *Semin Pediatr Neurol*, 5(3):180-189.

- Kirino T, Tamura A, Sano K. 1984. Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)*, 64(2):139-147.
- Kitagawa K, Matsumoto M, Oda T, Niinobe M, Hata R, Handa N, Fukunaga R, Isaka Y, Kimura K, Maeda H. 1990. Free radical generation during brief period of cerebral ischemia may trigger delayed neuronal death. *Neuroscience*, 35(3):551-558.
- Koh S, Tibayan FD, Simpson JN, Jensen FE. 2004. NBQX or topiramate treatment after perinatal hypoxia-induced seizures prevents later increases in seizure-induced neuronal injury. *Epilepsia*, 45(6):569-575.
- Kraig RP, Petito CK, Plum F, Pulsinelli WA. 1987. Hydrogen ions kill brain at concentrations reached in ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 7(4):379-386.
- Kuschinsky W, Gillardon F. 2000. Apoptosis and cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis*, 110:165-169.
- Lado FA, Laureta EC, Moshe SL. 2002. Seizure-induced hippocampal damage in the mature and immature brain. 2002. *Epileptic Disord* 4(2):83-97.
- Laiho KU, Shelburne JD, Trump BF. 1971. Observations on cell volume, ultrastructure, mitochondrial conformation and vital-dye uptake in Ehrlich ascites tumor cells. *Am J Pathol*, 65(1):203-230.
- Laroia N, McBride L, Baggs R, Guillet R. 1997. Dextromethorphan ameliorates effects of neonatal hypoxia on brain morphology and seizure threshold in rats. *Brain Res Dev Brain Res*, 100(1):29-34.
- LeBlanc MH, Farias LA, Evans OB, Vig V, Smith EE, Markov AK. 1990. Fructose-1,6-bisphosphate, when given immediately before reoxygenation, or before injury, does not ameliorate hypoxic-ischemic injury to the central nervous system in the newborn pig. *Crit Care Med*, 19(1):75-83

- LeBlanc MH, Vig V, Smith B, Parker CC, Evans OB, Smith EE. 1991. MK-801 does not protect against hypoxic-ischemic brain injury in piglets. *Stroke*, 22(10):1270-1275.
- LeBlanc MH, Li XQ, Huang M, Patel DM, Smith EE. 1995. AMPA antagonist LY293558 does not affect the severity of hypoxic-ischemic injury in newborn pigs. *Stroke*, 26(10):1908-1914.
- Leech RW, Alvord EC Jr. 1977. Anoxic-ischemic encephalopathy in the human neonatal period. The significance of brain stem involvement. *Arch Neurol*, 34(2):109-113.
- Lee SR, Kim SP, Kim JE. 2000. Protective effect of topiramate against hippocampal neuronal damage after global ischemia in the gerbils. *Neurosci Lett*, 281(2-3):183-186.
- Lees GJ. 1993. The possible contribution of microglia and macrophages to delayed neuronal death after ischemia. *J Neurol Sci* 114(2):119-122.
- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Bernichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M. 1995. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80(1):155-165.
- Legido A, Katsetos CD, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. 2000. Perinatal hypoxic ischemic encephalopathy: current and future treatments." *Int Pediatr*, 15(3):143-151.
- Levene MI, Blennow M, Whitelaw A, Hanks E, Fellman V, Hartley R. 1995. Acute effects of two different doses of magnesium sulphate in infants with birth asphyxia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 73(3):F174-F177.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91(4):479-489.

- Li Y, Sharov VG, Jiang N, Zaloga C, Sabbah HN, Chopp M. 1995. Ultrastructural and light microscopic evidence of apoptosis after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol*, 146(5):1045-1051.
- Li Y, Powers C, Jiang N, Chopp M. 1998. Intact, injured, necrotic, and apoptotic cells after focal cerebral ischemia in the rat. *J Neurol Sci*, 156(2):119-132.
- Lin S, Rhodes PG, Lei M, Zhang F, Cai Z. 2004. Alpha-Phenyl-n-tert-butyl-nitrone attenuates hypoxic-ischemic white matter injury in the neonatal rat brain. *Brain Res*, 1007(1-2):132-41.
- Linnik MD, Zobrist RH, Hatfield MD. 1993. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 24(12):2002-2009.
- Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 89(2):175-184.
- Liu YQ, Silverstein FS, Skoff R, Barks JD. 2002. Hypoxic-ischemic oligodendroglial injury in neonatal rat brain. *Pediatr Res*, 51(1):25-33.
- Liu YQ, Barks JD, Xu G, Silverstein FS. 2004. Topiramate extends the therapeutic window for hypothermia-mediated neuroprotection after stroke in neonatal rats. *Stroke*, 35:1460-1465.
- Lorek A, Takei Y, Cady EB, Wyatt JS, Penrice J, Edwards AD, Peebles D, Wylezinska M, Owen-Reece H, Kirkbride V. 1994. Delayed (secondary) cerebral energy failure after acute hypoxia-ischemia in the newborn piglet: continuous 48-hour studies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res*, 36(6): 699-706.

- Lupton BA, Hill A, Roland EH, Whitfield MF, Flodmark O. 1988. Brain swelling in the asphyxiated term newborn: pathogenesis and outcome. *Pediatrics*, 82(2):139-146.
- Lyden PD, Lonzo L. 1994. Combination therapy protects ischemic brain in rats. A glutamate antagonist plus a gamma-aminobutyric acid antagonist. *Stroke* 25(1):189-196.
- Ma J, Endres M, Moskowitz MA. 1998. Synergistic effects of caspase inhibitors and MK-801 in brain injury after transient focal cerebral ischemia in mice. *Br J Pharmacol*, 124(4):756-762.
- MacManus JP, Hill IE, Preston E, Rasquinha I, Walker T, Buchan AM. 1995. Differences in DNA fragmentation following transient cerebral or decapitation ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 15(5):728-737.
- Majno G, Joris I. 1995. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 146(1):3-15.
- Martin LJ, Brambrink A, Koehler RC, Traystman RJ. 1997a. Primary sensory and forebrain motor systems in the newborn brain are preferentially damaged by hypoxia-ischemia. *J Comp Neurol* 377(2):262-285.
- Martin LJ, Brambrink AM, Lehmann C, Portera-Cailliau C, Koehler R, Rothstein J, Traystman RJ. 1997b. Hypoxia-ischemia causes abnormalities in glutamate transporters and death of astroglia and neurons in newborn striatum. *Ann Neurol*, 42(3):335-348.
- Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C. 1998. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull*, 46(4):281-309.

- Matias-Guiu J, Martinez-Vazquez J, Ruibal A, Colomer R, Boada M, Codina A. 1986. Myelin basic protein and creatine kinase BB isoenzyme as CSF markers of intracranial tumors and stroke. *Acta Neurol Scand*, 73(5):461-465.
- McDonald JW, Silverstein FS, Johnston MV. 1987. MK-801 protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic damage. *Eur J Pharmacol*, 140(3):359-361.
- McDonald JW, Silverstein FS, Johnston MV. 1988. Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res*, 459(1):200-203.
- McDonald JW, Johnston MV. 1990. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Brain Res Rev*, 15(1):41-70.
- McDonald JW, Silverstein FS, Johnston MV. 1990. Magnesium reduces N-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated brain injury in perinatal rats. *Neurosci Lett*, 109(1-2):234-238.
- McDonald HW, Behrens MI, Chung C, Bhattacharyya T, Choi DW. 1997. Susceptibility to apoptosis is enhanced in immature cortical neurons. *Brain Res*, 759(2):228-232.
- McLaurin JA, Young VW. 1995. Oligodendrocytes and myelin. *Neurol Clin*, 13(1):23-49.
- Mehmet H, Yue X, Squier MV, Lorek A, Cady E, Penrice J, Saffar C, Wylezinska M, Kirkbride V, Cooper C, Brown GC, Wyatt JS, Reynolds EOR, Edwards AD. 1994. Increased apoptosis in the cingulate sulcus of newborn piglets following transient hypoxia-ischaemia is related to the degree of high energy phosphate depletion during the insult. *Neurosci Lett*, 181:121-125.
- Meister A, Anderson ME. 1983. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52:711-760.

- Mergner WJ, Trump BF. 1990. Cell death: mechanisms of acute and lethal cell injury. New York: Field & Wood Medical Pub.
- Meyer JE. 1953. Über die Lokalisation frühkindlicher Hirnschäden in arteriellen Grenzgebieten. Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr, 190(4):328-341.
- Michenfelder JD, Milde JH, Sundt TM Jr. 1976. Cerebral protection by barbiturate anesthesia: use after middle cerebral artery occlusion in Java monkeys. Arch Neurol, 33(5):345-350.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sarkmann B, Seeburg PH. 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. Neuron, 12(3):529-540.
- Mott JC. 1961. The ability of young mammals to withstand a total oxygen lack. Br Med Bull 17:144-148.
- Nakajima W, Ishida A, Lange MS, Gabrielson KL, Wilson MA, Martin LJ, Blue ME, Johnston MV. 2000. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. J Neurosci 20(21):7994-8004.
- Nelson C, Silverstein FS (1991) "Acute regionally specific reductions in cytochrome oxidase activity predict selective vulnerability to ischemic injury in perinatal rodent brain." Ann. Neurol. 30:482
- Nelson KB, Grether JK. 1995. Can magnesium sulphate reduce the risk of cerebral palsy in very low birthweight infants? Pediatrics, 95(2):263-269.
- Newcomb JK, Zhao X, Pike BR, Hayes RL. 1999. Temporal profile of apoptotic-like changes in neurons and astrocytes following controlled cortical impact injury in the rat. Exp Neurol, 158(1): 76-88.

- Nicotera P, Lipton SA. 1999. Excitotoxins in neuronal apoptosis and necrosis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19(6):583-591.
- Novelli A, Reilly JA, Lysko PG, Henneberg RC. 1988. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res*, 451(1-2):205-212.
- Oberhammer F, Fritsch G, Schmied M, Pavelka M, Printz D, Purchio T, Lassmann H, Schulte-Hermann R. 1993. Condensation of the chromatin at the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease. *J Cell Sci*, 104(Pt 2):317-326.
- Oka A, Belliveau MJ. 1993. Vulnerability of oligodendroglia to glutamate: pharmacology, mechanisms and prevention. *J Neurosci*, 13(4):1441-1453.
- Olney JW, Collins RC, Sloviter RS. 1986. Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. *Adv Neurol*, 44:857-877.
- Palmer C, Vannucci RC, Towfighi J. 1990. Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol. *Pediatr Res*, 27(4 Pt 1):332-336.
- Pasternak JF, Gorey MT. 1998. The syndrome of acute near-total intrauterine asphyxia in the term infant. *Pediatr Neurol*, 18(5):391-398.
- Pedraza L, Fidler L, Staugaitis SM, Colman DR. 1997. The active transport of myelin basic protein into the nucleus suggests a regulatory role in myelination. *Neuron*, 18(4):579-589.
- Peeters C, van Bel F. 2001. Pharmacotherapeutical reduction of post-hypoxic-ischemic brain injury in the newborn. *Biol Neonate*, 79:274-280.
- Petersson KH, Pinar H, Stopa EG, Faris RA, Sadowska GB, Hanumara RC, Stonestreet BS. 2002. White matter injury after cerebral ischemia in ovine fetuses. 51(6):768-776.

- Penrice J, Lorek A, Cady EB, Amess PN, Wylezinska M, Cooper CE, D'Souza P, Brown GC, Kirkbride V, Edwards AD, Wyatt JS, Reynolds EO. 1997. Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain during acute hypoxia-ischemia and delayed cerebral energy failure in the newborn piglet. *Pediatr Res*, 41(6):795-802.
- Petito CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, Plum F. 1987. Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology* 37(8):1281-1286.
- Pohl D, Bittigau P, Ishimaru MJ, Stadthaus D, Hubner C, Olney JW, Turski L, Ikonomidou C. 1999. N-Methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(5):2508-2513.
- Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. 1997. Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. *J Comp Neurol*, 378(1):70-87.
- Poulsen CF, Simeone TA, Maar TE, Smith-Swintosky V, White HS, Schousboe A. 2004. Modulation by topiramate of AMPA and Kainate mediated calcium influx in cultured cerebral cortical, hippocampal and cerebellar neurons. *Neurochem Res*, 29(1):275-282.
- Pu Y, Li QF, Zeng CM, Gao J, Qi J, Luo DX, Mahankali S, Fox PT, Gao JH. 2000. Increased detectability of alpha brain glutamate/glutamine in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Neuroradiol*, 21(1):203-212.
- Puka-Sundvall M, Wallin C, Gilland E, Hallin U, Wang X, Sandberg M, Karlsson J, Blomgren K, Hagberg H. 2000. Impairment of mitochondrial respiration after cerebral hypoxia-ischemia in immature rats: relationship to activation of caspase-3 and neuronal injury." *Brain Res Dev Brain Res*, 125(1-2):43-50.

- Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. 1993. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*, 262(5134):695-700.
- Raju TNK. 1992. Some animal models for the study of perinatal asphyxia. *Biol Neonate*, 62:202-214.
- Represa A, Tremblay E, Ben-Ari Y. 1989. Transient increase of NMDA-binding sites in human hippocampus during development. *Neurosci Lett*, 99(1-2):61-66.
- Rezaie P, Dean A. 2002. Periventricular leukomalacia, inflammation and white matter lesions within the developing nervous system. *Neuropathology* 22(3):106-132.
- Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. 1981. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol*, 9(2):131-141.
- Riikonen RS, Kero PO, Simell OG. 1992. Excitatory amino acids in cerebrospinal fluid in neonatal asphyxia. *Pediatr Neurol*, 8(1):37-40.
- Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, Lee VM, Neugebauer E, McIntosh TK. 1995. Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. *Am J Pathol*, 147(6): 1575-1583.
- Roohey T, Raju TNK, Moustogiannis AN. 1997. Animal models for the study of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a critical analysis. *Early Hum Dev* 47(2):115-146.
- Rorke LB. 1982. *Pathology of perinatal brain injury*. New York: Raven Press.
- Rorke LB. 1992. Anatomical features of the developing brain implicated in pathogenesis of hypoxic-ischemic injury. *Brain Pathol*, 2(3):211-221.
- Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner-Johnston A, Lefebvre C, Kang X. 1995. The gene for neuronal apoptosis

inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 80(1):167-178.

Sarnat HB, Sarnat MS. 1976. Neonatal encephalopathy following fetal distress: a clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol*, 33(10):696-705.

Schmitt HP. 1984. Multicystic encephalopathy – A polyetiologic condition in early infancy: morphologic, pathogenetic and clinical aspects. *Brain Dev*, 6(1):1-9.

Scholz W. 1963. Topistic lesions. In Schade JP, McMenemey WH, Hrsg. *Selective Vulnerability of the brain in hypoxaemia*. Philadelphia: F. A. Davis

Shank RP, Gardocki JF, Streeter AJ, Maryanoff BE. 2000. An overview of the preclinical aspects of topiramate: pharmacology, pharmacokinetics, and mechanism of action. *Epilepsia*, 41(Suppl.1):S3-S9.

Siesjö BK, Wieloch T. 1985. Molecular mechanisms of ischemic brain damage: Ca-related events. in Plum F, Pulsinelli W, Hrsg. *Cerebrovascular Diseases*. New York: Raven Press.

Siesjö BK, Agardh CD, Bengtsson. 1989. Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 1(3):165-211.

Silverstein FS, Buchanan K, Johnston MV. 1986a. Perinatal hypoxia-ischemia disrupts striatal high-affinity 3H-glutamate uptake into synaptosomes. *J Neurochem*, 47(5):1614-1619.

Silverstein FS, Buchanan K, Hudson C, Johnston MV. 1986b. Flunarizine limits hypoxia-ischemia induced morphologic injury in immature rat brain. *Stroke* 17(3):477-482.

Silverstein FS, Naik B, Simpson J. 1991. Hypoxia-ischemia stimulates hippocampal glutamate efflux in perinatal rat brain: an in vivo microdialysis study. *Pediatr Res*, 30(6):587-590.

- Skoff RP, Bessert DA, Barks JD, Song D, Cerghet M, Silverstein FS. 2001. Hypoxic-ischemic injury results in acute disruption of myelin gene expression and death of oligodendroglial precursors in neonatal mice. *Int J Dev Neurosci.* 19(2):197-208.
- Spandou E, Karkavelas G, Soubasi V, Avgovstides-Savvopoulou P, Loizidis T, Guiba-Tziampiri O. 1999. Effect of ketamine on hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Brain Res*, 819(1-2):1-7.
- Speer CP, Gahr M. 2000. Pädiatrie. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- Stohrer M, Eichinger A, Schlachter M, Stangassinger M. 1998. Protective effect of vitamin E in a rat model of focal cerebral ischemia. *Z Naturforsch* 53(3-4):273-278.
- Stonestreet BS, Burgess GH, Cserr HF. 1992. Blood-brain barrier integrity and brain water and electrolytes during hypoxia/hypercapnia and hypotension in newborn piglets. *Brain Res*, 590(1-2):263-270.
- Streicher E, Wisniewski H, Klatzo I. 1965. Resistance of immature brain to experimental cerebral edema. *Neurology*, 15:833-836.
- Stuiver BT, Douma BR, Bakker R, Nyakas C, Luiten PG. 1996. In vivo protection against NMDA-induced neurodegeneration by MK-801 and nimodipine: Combined therapy and temporal course of protection. *Neurodegeneration* 5(2):153-159.
- Tan WK, Williams CE, During MJ, Mallard CE, Gunning MI, Gunn AJ, Gluckman PD. 1996. Accumulation of cytotoxins during the development of seizures and edema after hypoxic-ischemic injury in late gestation fetal sheep. *Pediatr Res*, 39(5):791-797.

- Tan S, Zhou F (1997) "Administration of antioxidants to the mother after onset of fetal bradycardia ameliorates fetal brain injury in rabbits." *Pediatr Res* 41:182
- Taverna S, Sancini G, Mantegazza M, Franceschetti S, Avanzini G. 1999. Inhibition of transient and persistent Na⁺ current fractions by the new anticonvulsant topiramate. *J Pharmacol Exp Ther*, 288(3):960-968.
- Till U. 1999. *Pathophysiologie / Pathobiochemie systematisch*. Bremen: Uni-Med-Verlag.
- Thoresen M, Penrice J, Lorek A, Cady EB, Wylezinska M, Kirkbride V, Cooper CE, Brown GC, Edwards AD, Wyatt JS. 1995. Mild hypothermia after severe transient hypoxia-ischemia ameliorates delayed cerebral energy failure in the newborn piglet. *Pediatr Res*, 37(5):667-670.
- Thoresen M, Haaland K, Loberg EM, Whitelaw A, Apricena F, Hanko E, Steen PA. 1996. A piglet survival model of posthypoxic encephalopathy. *Pediatr Res*, 40(5):738-748.
- Tomei LD, Shapiro JP, Cope FO. 1993. Apoptosis in C3H/10T1/2 mouse embryonic cells: evidence for internucleosomal DNA modification in the absence of double-strand cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(3):853-857.
- Tominaga T, Kure S, Narisawa K, Yoshimoto T. 1993. Endonuclease activation following focal ischemic injury in the rat brain. *Brain Res*, 608(1):21-26.
- Towfighi J, Zec N, Yager J, Housman C, Vanucci RC. 1995. Temporal evolution of neuropathologic changes in an immature rat model of cerebral hypoxia: a light microscopic study. *Acta Neuropathol (Berl)*, 90(4):375-386.
- Van Bel F, Shadid M, Moison RM, Dorrepaal CA, Fontijn J, Monteiro L, Van De Bor M, Berger HM. 1998. Effect of allopurinol on postasphyxial free radical formation, cerebral hemodynamics and electrical brain activity. *Pediatrics*, 101(2):185-193.

- Van der Eecken HM. 1959. Anastomoses between the leptomeningeal arteries of the brain: their morphological, pathological and clinical significance. Springfield, Ill: Charles C Thomas Publishing.
- Vannucci RC. 1990. Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage. *Pediatr Res*, 27(4 Pt 1):317-326.
- Vannucci RC. 1992. Cerebral carbohydrate and energy metabolism in perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Brain Pathol*, 2(3):229-234.
- Volpe JJ, Pasternak JF. 1977. Parasagittal cerebral injury in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: clinical and neuroradiologic features. *J Pediatr* 91(3):472-476.
- Volpe JJ. 1995. *Neurology of the Newborn*. Dritte Aufl. Philadelphia: WB Saunders Company.
- Volpe JJ. 1997. Brain injury in the premature infant: neuropathology, clinical aspects, pathogenesis and prevention. *Clin Perinatol*, 24(3):567-587.
- Volpe JJ. 2001. Perinatal Brain Injury: From pathogenesis to neuroprotection. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 7:56-64.
- Wagner CL, Eicher DJ, Katikaneni LD, Barbosa E, Holden KR. 1999. The use of hypothermia: a role in the treatment of neonatal asphyxia? *Pediatr Neurol*, 21(1):429-443.
- Wasterlain CG, Niquet J, Thompson KW, Baldwin R, Liu H, Sankar R, Mazarati AM, Naylor D, Katsumori H, Suchomelova L, Shirasaka Y. 2002. Seizure-induced neuronal death in the immature brain. *Prog Brain Res* 135:335-53.
- Wells RJ, Friedman WF, Sobel BE. 1972. Increased oxidative metabolism in the fetal and newborn lamb heart. *Am J Physiol* 222(6):1488-1493.

- White HS, Brown SD, Woodhead JH, Skeen GA, Wolf HH. 1997. Topiramate enhances GABA-mediated chloride flux and GABA-evoked chloride currents in murine brain neurons and increases seizure threshold. *Epilepsy Res*, 28(3):167-179.
- Williams CE, Gunn AJ, Mallard C, Gluckman PD. 1992. Outcome after ischemia in the developing sheep brain: an electroencephalographic and histological study. *Ann Neurol*, 31(1):14-21.
- Wirrell EC, Armstrong EA, Osman LD, Yager JY. 2001. Prolonged seizures exacerbate perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatr Res* 50(4):445-454.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-306.
- Yang Y, Shuaib A, Li Q, Siddiqui MM. 1998. Neuroprotection by delayed administration of topiramate in a rat model of middle cerebral artery embolization. *Brain Res*, 804(2):169-176.
- Yang Y, Li Q, Shuaib A. 2000. Enhanced neuroprotection and reduced hemorrhagic incidence in focal cerebral ischemia of rat by low dose combination therapy of urokinase and topiramate. *Neuropharmacology*, 39(5):881-888.
- Yue X, Mehmet H, Penrice J, Cooper C, Cady E, Wyatt JS, Reynolds EOR, Edwards AD, Squier MV. 1997. Apoptosis and necrosis in the newborn piglet brain following transient cerebral hypoxia-ischemia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23:16-25.

9. ANHANG

9. 1. Abbildungsverzeichnis

Seite

Abb. 1: Pathophysiologie der hypoxisch-ischämischen Neuronenschädigung	14
Abb. 2: Strukturformel von Topiramat	37
Abb. 3: Nächtliche Anfallsaktivität während der Nachbeobachtungsphase	51
Abb. 4: Neurologisches Outcome während der Nachbeobachtungsphase	52
Abb. 5: Mittlerer Hypoxie-Ischämie-Score der Hirnregionen in der HE-Färbung	53
Abb. 6: Subregionenspezifischer Hypoxie-Ischämie-Score im Hippocampus	56
Abb. 7: HE, Kontrollgruppe, 100 ×	57
Abb. 8: HE, Kontrollgruppe, 400 ×	57
Abb. 9: HE, mittelgradiger Schaden, 100 ×	57
Abb. 10: HE, mittelgradiger Schaden, 400 ×	57
Abb. 11: HE, generalisierter Schaden, 100 ×	57
Abb. 12: HE, generalisierter Schaden, 400 ×	57
Abb. 13: Mittlerer TUNEL-Score der einzelnen Hirnregionen	58
Abb. 14: TUNEL-positive Zellen, 200 ×	59
Abb. 15: TUNEL-positive Zellen, 400 ×	59
Abb. 16: Ergebnisse der MBP-Färbung	61
Abb. 17: Apoptose-Nekrose-Kontinuum des neuronalen Zelltods	73
Tab. 1: Aufteilung der Tiere auf die Versuchsgruppen	40
Tab. 2: Neuroscore	43
Tab. 3: Anfalls-Score	43
Tab. 4: Hypoxie-Ischämie-Score	48
Tab. 5: TUNEL-Score	50
Tab. 6: Korrelation zwischen Neuroscore und HE-Grading	60

9. 2. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nico Fiedler
Geboren: am 31. Dezember 1978 in Heiligenstadt (Thüringen)
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Wohnhaft: 07743 Jena, Wittenbergstraße 4
Eltern: Bernhard Fiedler, Elisabeth Fiedler (geb. Hartleib)

Schulbildung

09 / 1985 – 06 / 1992 Regelschule Uder (Thüringen)
09 / 1992 – 06 / 1997 Staatliches Gymnasium Heiligenstadt (Thüringen)

Zivildienst

09 / 1997 – 09 / 1998 St.-Elisabeth-Krankenhaus Worbis (Thüringen)

Studium

10 / 1998 – 05 / 2005 Studium der Humanmedizin an der FSU Jena
04 / 2004 – 03 / 2005 Praktisches Jahr im Katholischen Krankenhaus Erfurt
(Innere Medizin), im Kantonsspital Laufen, Schweiz
(Chirurgie), im Universitätsklinikum Jena (Neurologie)

Universitäre Laufbahn

07 / 2002 Beginn der Bearbeitung des Promotionsthemas der vorliegenden Arbeit am Institut für Pathophysiologie und am Institut für Pathologie, Jena
10 / 2005 Beginn der Tätigkeit als Assistenzarzt in der Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Jena

Ort, Datum

Unterschrift

9. 3. Liste der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

Schubert S, Brandl U, Brodhun M, Ulrich C, Spaltmann J, Fiedler N, Bauer R. 2005.
Neuroprotective effects of topiramate after hypoxia-ischemia in newborn piglets.
Brain Res 1058:129-136.

9. 4. Danksagung

Meinem Betreuer Dr. Michael Brodhun (Institut für Pathologie der FSU Jena, Bereich Neuropathologie) danke ich für seine Hilfestellung und Förderung meines gedanklichen Entwicklungsprozesses während der Bearbeitung des vorliegenden Promotionsthemas. Danke für den Ansporn, die kritischen Hinweise und die Unterstützung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. U. Brandl (Klinik für Pädiatrie, Jena), Herrn Prof. Dr. R. Bauer (Institut für Pathophysiologie) und Frau Dr. Schubert (Klinik für Pädiatrie, Jena) für die Organisation und Durchführung der Tierexperimente, die Überlassung des Untersuchungsmaterials, das Vertrauen in die selbstständige Auswertung, sowie für zahlreiche Ratschläge und stimulierende Anregungen, die wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt im weiteren Frau Ernst (Institut für Pathophysiologie) für die Hilfe bei organisatorischen Fragen in Bezug auf die zugrundeliegende Studie, sowie Frau Klupsch (Institut für Pathologie, Bereich Neuropathologie, FSU) für ihren Einsatz beim Schneiden des paraffineingebetteten Materials und ihre Unterstützung während meines Einarbeitungsprozesses in die histologischen Techniken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Freunden für ihr Verständnis und ihre Ermunterungen.

9. 5. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. Michael Brodhun, Dr. Susanne Schubert, Prof. Dr. Ulrich Brandl, Prof. Dr. Reinhard Bauer,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers